

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Determinación de biotoxina marina veneno paralizante
de molusco en *Aulacomya ater* “choro común” y
Argopecten purpuratus “concha de abanico”
provenientes del litoral central peruano**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Microbiología y Parasitología

AUTOR

Julio Manuel Reyes Chavez

ASESOR

Jorge León Quispe

Lima - Perú

2012

ÍNDICE

	Pagina
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ABREVIATURAS	III
LISTA DE TABLAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Origen de las biotoxinas Marinas	3
2.2. Veneno Paralizante de Moluscos (VPM)	4
2.3. Estructura y propiedades químicas de VPM	6
2.4. Metabolismo de VPM en moluscos bivalvos	6
2.5. Toxicología	8
2.5.1. Mecanismos de acción	8
2.5.2. Toxicidad en modelos animales	9
2.5.3. Toxicidad en seres humanos	11
2.5.4. Síntomas y tratamiento	12
2.6. Determinación de Veneno Paralizante de Moluscos	14
2.6.1. Bioensayos	14
2.6.2. Ensayos <i>in vitro</i> .	15
2.6.3. Análisis Químico	17
2.6.3.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	17
2.6.3.2. Espectrometría de masas	18
2.7. Distribución mundial y situación actual en el Perú	19
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
3.1. HIPÓTESIS	26

3.2. OBJETIVOS GENERALES	26
3.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	27
4.1. Lugar de muestreo	27
4.2. Materiales	28
4.2.1. Material Biológico	28
4.2.1.1. Moluscos bivalvos	28
4.2.1.2. Ratones Swiss	28
4.2.1.3. Estandar de Saxitoxina	28
4.2.2. Datos sobre Fitoplancton Potencialmente Tóxico	28
4.3. Metodología	29
4.3.1. Muestreo de moluscos bivalvos	29
4.4. Determinación de Veneno Paralizante de Moluscos	30
4.4.1. Preparación de la curva patrón y cálculo del Factor de Conversión	30
4.4.2. Preparación de la muestra	31
4.4.3. Extracción de la toxina	31
4.4.4. Bioensayo en el ratón	31
4.4.5. Cálculo de la toxicidad de VPM	31
4.5. Diseño y Análisis estadístico de los resultados	32
V. RESULTADOS	33
5.1. Estandarización del Bioensayo	33
5.2. Muestras ensayadas	34
5.3. Datos sobre Fitoplancton Potencialmente Tóxico	34
VI. DISCUSIÓN	54
VII. CONCLUSIONES	58
VIII. RECOMENDACIONES	59
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
XI. ANEXOS	65

RESUMEN

La Biotoxina Marina Veneno Paralizante de Moluscos (VPM) causa el síndrome denominado envenenamiento por consumo de mariscos, y se origina cuando este último se alimenta de especies de dinoflagelados y cianobacterias que producen dichas toxinas durante las Floraciones Algales Nocivas (FAN). El Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES), es la entidad encargada de monitorear la presencia de esta toxina en productos hidrobiológicos y de esta manera garantiza la calidad sanitaria en el cultivo, extracción y comercialización principalmente de mariscos de exportación. El objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia de la biotoxina VPM en *Aulacomya ater* (choro común) y *Argopecten purpuratus* (concha de abanico) comercializados en el terminal Pesquero de Ventanilla y el Desembarcadero Pesquero Artesanal de Ancón. Durante 21 semanas (octubre 2008 – marzo 2009) se proceso muestras de moluscos para la detección de VPM mediante, el método normalizado de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC 959.08.2005) conocido como el método del bioensayo en ratón. De las 79 muestras analizadas, 37 eran concha de abanico y 42 choro común (*Aulocomya ater*), este ultimo presentó niveles detectables de VPM en tres ocasiones. Siendo la concentración máxima detectada de 48 µg Saxitoxina equivalente/100 g que está por debajo del límite legal que en nuestro país es de 80 µg Saxitoxina equivalente/100 g de carne. En *Argopecten purpuratus* no se detecto la presencia de toxinas VPM o estas se encontraban por debajo del límite de cuantificación del bioensayo que en nuestro caso fue de 37 µg STX/100 g⁻¹. En conclusión se puede afirmar que existe un riesgo ostensible para la salud del consumidor debido a la presencia de las toxinas VPM en muestras de moluscos comercializados en el mercado local.

Palabras clave: Saxitoxina, *Aulocomya ater*, *Argopecten purpuratus*, bioensayo en ratón, biotoxinas marina

ABSTRACT

The Marine Biotoxin Paralytic Shellfish Poison (PSP) causes syndrome called, poisoning seafood consumption, and is caused when the latter feeds of dinoflagellates and cyanobacteria species that produce these toxins during the Harmful Algal Blooms (HABs). SANIPES (Servicio Nacional de Sanidad Pesquera), is in charge of monitoring the presence of this toxin in seafood products guaranteeing sanitary quality in the culture, harvesting and marketing of seafood export mainly. The aim of this research was to determine the presence of PSP in *Aulacomya ater* (common mussel) and *Argopecten purpuratus* (scallop) marketed in the “Terminal Pesquero de Ventanilla” and “Desembarcadero Pesquero Artesanal de Ancón”. For 21 weeks (October 2008 - March 2009) were processed shellfish samples for the detection of PSP by the standard of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC 959.08.2005) known as the mouse bioassay method. Of the 79 samples tested, 37 were scallops and 42 common mussel, the latter showed detectable levels of VPM three times. The maximum concentration detected was 48 ug eq. Saxitoxin /100 g which is below the legal limit, which in our country is 80 ug eq. Saxitoxin/100 g of meat. In *Argopecten purpuratus* was not possible to detect PSP or these were below the quantification limit of the bioassay which in our case was 37 ug eq. STX/100 g. In conclusion, we can say that there is an ostensible risk to consumer health due to the presence of toxins PSP in shellfish samples sold in the local market.

Keywords: Saxitoxin, *Aulocomya ater*, *Argopecten purpuratus*, mouse bioassay, marine biotoxins.

ABREVIATURAS

AECID	Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AOAC	Association of Analytical Communities
ANZFA	Autoridad Alimentaria de Nueva Zelanda y Australia
CE	Concejo Europeo
CEFAS	The Centre for Enviroment, Fisheries and Aquaculture Sciences UK
CEN	Comité Europeo de Normalización
CERPER	Certificaciones del Perú S.A
COI	Comisión Oceanográfica Intergubernamental
CRLMB	Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas de la Unión Europea
DL50	Dosis letal 50
dcGTXs	Decarbamoil-Gonyaulatoxinas
dcneoSTX	Decarbamoil neosaxitoxina
dcSTX	Decarbamoil saxitoxina
doSTX	Deosaxytoxina
EFSA	European Food Safety Authority
EN	Envenenamiento Neurotóxico
FAN	Floraciones Algales Nocivas
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FC	Factor de Conversión
FD	Factor de Dilución
FLD	Fluorescence Detector
FTP	Fitoplancton potencialmente tóxico
GTXs	Gonyaulatoxinas
HPLC	High-performance liquid chromatography
IEO	Instituto Español de Oceanografía

IMARPE	Instituto del Mar del Perú
ISP	Instituto de Salud Pública de Chile
ITP	Instituto Tecnológico Pesquero del Perú
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de detección
neoSTX	Neosaxitoxina
pc	Peso corporal
pH	Potencial de hidrogeniones
PSP	Paralytic Shellfish Poison
RPM	Revoluciones por minuto
SANIPES	Servicio Nacional de Sanidad Pesquera
SM	Solución Madre
STX	Saxitoxina
Stx eq	Saxitoxina equivalente
Tm	Tiempo de muerte
UE	Unión Europea
UNESCO	United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization
UPCH	Universidad Peruana Cayetano Heredia
UPRSIG	Unidad De Percepción Remota y Sistemas De Información Geográfica
UR	Unidad Ratón
UR	Unidad Ratón
URC	Unidad Ratón Corregidas
UV-LV	Ultravioleta-Luz Visible
VAM	Veneno Amnésico de Moluscos
VCP	Veneno Ciguatérico de Pescado
VDM	Veneno Diarreico de Moluscos
VPM	Veneno Paralizante de Moluscos

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
Tabla 1. Toxinas marinas síntomas y microalgas relacionadas.	03
Tabla 2. Estructura de Toxinas VPM.	07
Tabla 3. Toxicidad aguda de la STX en ratones.	09
Tabla 4. Toxicidad relativa de VPM en ratón.	10
Tabla 5. Síntomas clínicos causados por VPM.	13
Tabla 6. Principales especies microalgales asociada a eventos tóxicos en el Cono Sur Americano.	24
Tabla 7. Eventos VPM en el Perú 2004-2009.	25
Tabla 8. Cálculo del Factor de Conversión (FC) 1era sesión de trabajo.	36
Tabla 9. Cálculo del FC dilución estándar 0,416 µg/mL.	37
Tabla 10. Cálculo del FC dilución estándar 0,400 µg/mL.	37
Tabla 11. Cálculo del FC dilución estándar 0,384 µg/mL.	38
Tabla12. Cálculo del FC 1era sesión de trabajo (repetición).	39
Tabla 13. Cálculo del FC dilución estándar 0,416 µg/mL (repetición).	40
Tabla 14. Cálculo del FC dilución estándar 0,400 µg/mL (repetición).	40
Tabla 15. Cálculo del FC dilución estándar 0,384 µg/mL (repetición).	41
Tabla 16. 1er Cálculo parcial del FC.	42
Tabla 17. 2do Cálculo parcial del FC.	42
Tabla 18. Cálculo del FC final y límite de cuantificación.	42
Tabla 19. Toxinas VPM en <i>Argopecten purpuratus</i> (concha de abanico).	43
Tabla 20. Toxinas VPM en <i>Aulacomya ater</i> (choro común).	44
Tabla 21. Fitoplancton potencialmente tóxico, en la zona de extracción de Ancón.	46
Tabla 22. Fitoplancton potencialmente tóxico en la zona de extracción de Huacho.	47

Tabla 23. Fitoplancton potencialmente tóxico en la zona de extracción de.
Samanco.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
Figura 1.	Concentraciones de microalgas que causan toxicidad en Moluscos.	05
Figura 2.	Transporte de muestras al laboratorio.	29
Figura. 3.	Presencia de toxinas VPM <i>en Aulacomya ater</i> comercializados en la localidad de Ancón.	45
Figura 4.	Fitoplancton potencialmente tóxico relacionado a toxinas VPM en Ancón.	51
Figura 5.	Fitoplancton potencialmente tóxico relacionado a toxinas VPM en Huacho.	52
Figura 6.	Fitoplancton potencialmente tóxico relacionado a toxinas VPM en Samanco.	53

I. INTRODUCCIÓN.

Dentro de las biotoxinas marinas conocidas hasta la fecha, el Veneno Paralizante de Moluscos (VPM) que es el causante del síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos, es el más peligroso. Estas toxinas son producidas por diversas especies de dinoflagelados del género *Alexandrium* y especies como *Pyrodinium bahamense* var. *compresum* y *Gymnodinium catenatum*, así como por algunas cianobacterias como *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Lyngbya wollei* (Hernández y Gárate, 2006).

De las miles de especies de microalgas marinas conocidas, aproximadamente 300 pueden ocasionar las llamadas floraciones algales conocidas como “marea rojas”, pero solo entre 70 y 80 especies pueden tener la capacidad de producir toxinas, en este caso estas floraciones son conocidas como Floraciones Algales Nocivas o FAN (Hallegraeff *et al.*, 2003).

América del Sur registra floraciones algales relacionadas a casos de Veneno Paralizante de Moluscos en Argentina, Brasil, Chile, Uruguay y Venezuela. En todos estos países se han registrado casos fatales por consumo de moluscos con concentraciones elevadas de esta toxina, siendo un problema de salud pública en toda la región (FAO, 2005).

En nuestro país, la alimentación en base al consumo de moluscos bivalvos es muy importante, algunos son más accesibles a los sectores económicos de escasos recursos, como es el caso del “choro” (*Aulacomya ater*). Un tanto diferente es la situación de la “concha de abanico” (*Argopecten purpuratus*) que debe su mayor importancia al ser exportada en gran cantidad, puesto que tiene un excelente mercado en los países de la Unión Europea, por estos motivos el estudio de las VPM en estas dos especies es de suma importancia (Quiñones, 2007).

La falta de información entre los profesionales de la salud sobre esta problemática es preocupante; no se tienen registros médicos de este tipo de intoxicaciones en humanos, probablemente debido a que se desconoce el cuadro clínico y no se diagnostican los casos, pasando de manera desapercibida como otro padecimiento; pues los síntomas de vómitos y náuseas son comunes a otras enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) y los síntomas graves como parálisis e hipotensión pueden ser confundidos por envenenamiento causado por pesticida (Hernández y Gárate, 2006).

Los métodos de detección no son muy difundidos y solo son desarrollados por unos cuantos laboratorios privados y uno estatal, el del Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP). El método oficial que se utiliza en la actualidad es el bioensayo en ratón de la “Asociación Oficial de Químicos Analistas” (AOAC 959.08.2005). Por otro lado, el Instituto del Mar de Perú (IMARPE) realiza investigaciones en cuanto a Floraciones Algales Nocivas (FAN) pero se limita al estudio biológico de las especies microalgales y no a las toxinas que éstas producen ni al recurso (Sánchez *et al.*, 2008).

El estudio de las biotoxinas marinas tiene un impacto desde el punto de vista de la prevención, puesto que un episodio tóxico importante traería a nuestro país no solo pérdidas económicas sino también podría causar pérdidas humanas como ha ocurrido en países vecinos (García *et al.*, 2005). Si tenemos presente que Perú ya registró presencia de toxinas VPM en nuestro litoral, el cual ocasionó el cierre de algunas áreas de cultivo durante los últimos años, además que la vigilancia de los moluscos que se comercializan en el mercado interno es casi nula (SANIPES, 2010a). Este contexto nos lleva a plantear este trabajo que pretende determinar la presencia del veneno paralizante de moluscos (VPM) en *Aulacomya ater* (choro) y *Argopecten purpuratus* (concha de abanico) expendidos en mercados formales e informales del Departamento de Lima entre los meses de octubre 2008 a marzo 2009.

II. MARCO TEÓRICO.

2.1. Origen de las biotoxinas marinas

Las algas planctónicas microscópicas son de suma importancia para los moluscos bivalvos que se alimentan por filtración, así como para las larvas de crustáceos y peces con escamas de importancia comercial, siendo la base de la red trófica. De las 5000 especies de microalgas marinas existentes, aproximadamente 300 pueden ocasionar las denominadas “mareas rojas”, pero no todas son sospechosas de tener la capacidad de producir toxinas; en este caso estas floraciones son conocidas como Floraciones Algales Nocivas o FAN (Tabla 1) (Moestrup *et al.*, 2008).

TABLA 1. Toxinas marinas, síntomas y microalgas relacionadas (Hernández y Gárate, 2006).

Tipo de toxinas	Síntomas generales	Especies responsables
PARALIZANTES Veneno Paralizante Moluscos (VPM).	Sensación de hormigueo, Entumecimiento de cara cuello, manos, náuseas, vómito y muerte por paro respiratorio	<i>Gymnodinium catenatum</i> <i>Alexandrium acatenella</i> <i>Alexandrium catenella</i> <i>Alexandrium minutum</i> <i>Alexandrium tamarensis</i> <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> <i>Alexandrium spp</i> <i>Pyrodinium bahamense v. compressum</i> Cianobacterias
DIARREICAS Veneno Diarreico de Moluscos (VDM).	Diarrea, náuseas, vómito y la exposición crónica promueve la formación de tumores en el sistema digestivo	<i>Dinophysis acuminata</i> <i>Dinophysis caudata</i> <i>Dinophysis. norvegica</i> <i>Dinophysis fortii</i> <i>Dinophysis sacculus</i> <i>Dinophysis miles</i> <i>Dinophysis spp</i> <i>Prorocentrum lima</i> . <i>Prorocentrum spp</i>
AMNESICAS Veneno Amnésico de Moluscos (VAM).	Síntomas gastrointestinales como: vómito, diarrea y calambres. Síntomas neurológicos: Desorientación, náuseas, vértigo, confusión y pérdida temporal de la memoria.	<i>Pseudo-nitzschia australis</i> <i>Pseudo-nitzschia pungens var. multiseriata</i> <i>Pseudo-nitzschia seriata</i> <i>Amphora coffaeiformis</i> <i>Nitzschia navis-varingica</i>
NEUROTOXICAS Envenenamiento neurotóxico (EN).	Escalofríos, dolor de cabeza, debilidad muscular, náuseas, vómito y muerte por paro respiratorio	<i>Karenia brevis</i> <i>Karenia selliformis</i> <i>Karenia bidigitata</i> <i>Karenia spp.</i>

Las floraciones algales nocivas aparecen de manera espontánea, ni el momento en que aparece una floración, ni la densidad de la población es predecible; puesto que influyen, sobre el fenómeno circunstancias climáticas e hidrográficas. Una FAN comienza como una pequeña población de dinoflagelados tóxicos en fase vegetativa o como quiste (hipnozigote) en el sedimento de fondo. Ciertas condiciones climáticas y medioambientales, como por ejemplo cambios en la salinidad, un aumento de la temperatura del agua, de los nutrientes y de la radiación solar fomenta la germinación de los quistes, que ingresan en un estado vegetativo, en el que se reproducen rápidamente. Una vez desencadenada la floración, se ingresa en una fase de crecimiento exponencial de la población. El mayor porcentaje de células tóxicas se registra generalmente en la mitad de esta fase de crecimiento exponencial; luego ocurre una disminución de nutrientes del agua y dióxido de carbono limitando el crecimiento de la población. Se ingresa a una fase estacionaria y el agua adquiere el color rojo, que se conoce como marea roja. Las condiciones ambientales desfavorables ocasionan la destrucción de la población, los dinoflagelados forman quistes de resistencia que se sedimentan en el fondo hasta la próxima floración (Mons *et al.*, 1998).

Los principales grupos de toxinas marinas o venenos microalgales descritos hasta la fecha y que afectan directamente al hombre son: el Veneno Paralizante de Moluscos (VPM), Toxinas Lipofílicas de Molusco (VDM), Veneno Amnésico de Molusco (VAM), Ciguatera o Veneno Ciguatérico de Pescado (VCP), Veneno neurotóxico (NP) y Microcystinas, producidas por algas verdes-azuladas (cianobacterias) en aguas salobres y lacustres (Yasumoto y Murata, 1993).

2.2. Veneno paralizante de moluscos (VPM)

La razón por la cual ciertas microalgas se tornan tóxicas no están resueltas del todo; en el caso de las toxinas VPM se ha propuesto una relación entre la presencia de

bacterias y la toxicidad de algunos dinoflagelados, como en el caso de *Alexandrium catenella*, comúnmente responsable de la presencia de toxina VPM (Uribe y Espejo, 2003). Estas afirmaciones originan discrepancias con otras investigaciones sobre este mismo punto (Martins et al., 2003). En general la concentración celular necesaria de microalgas tóxicas para que los moluscos que se alimentan de ellas, sobrepasen los niveles peligrosos de toxina no está determinada. Dependiendo de la especie; algunas microalgas producen toxinas tan potentes, que pueden resultar dañinas aunque no alcancen concentraciones celulares elevadas que coloreen el agua (Figura 1) (Reguera, 2002).

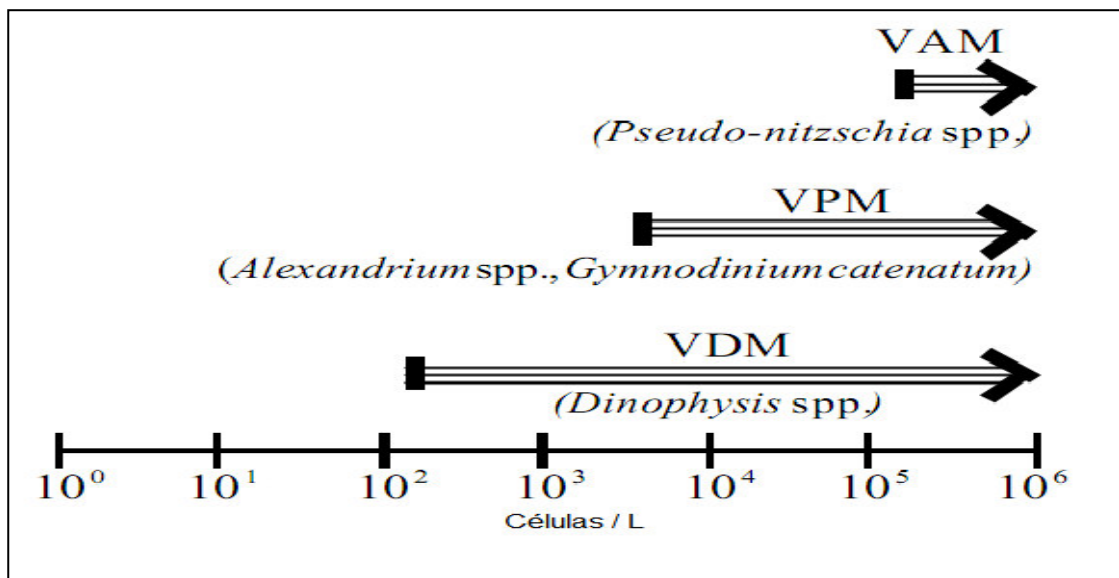


Figura 1. Concentraciones de microalgas que causan toxicidad en moluscos. VAM: Veneno amnésico de molusco; VPM: Veneno paralizante de moluscos; VDM: Veneno diarreico de moluscos. (Reguera, 2002)

En el mundo, las toxinas VPM son responsables de al menos 2000 casos de intoxicación paralizante por mariscos por año, con una mortalidad del 15 % (Hallegraeff et al., 2003). En los últimos 20 años se ha registrado un aumento de las intoxicaciones causadas por toxinas VPM. Sin embargo, aun no se sabe si el aumento en la frecuencia, intensidad y distribución geográfica es la consecuencia de los progresos en la identificación, detección, la expansión del cultivo y el aumento del consumo de

mariscos o a un real incremento de las VPM, relacionados a FAN, causadas por la eutrofización y cambios climatológicos (Hallegraeff *et al.*, 2003).

2.3 Estructura y propiedades químicas de toxinas VPM

El grupo de toxinas que conforman las VPM están básicamente constituidas por un núcleo tetrahidropurínico. Todas ellas son análogas a la Saxitoxina (STX), la primera toxina tipificada y la más estudiada. Se han descrito más de 26 derivados de la STX (FAO, 2005). Estructuralmente, en función de los radicales, se pueden establecer 4 grupos (Tabla 2). Así: toxinas carbamato (Carbamoil Toxinas), toxinas N-sulfocarbamatos (N-sulfocarbamoil Toxinas), toxinas decarbamatos (Decarbamoil Toxinas) y toxinas deoxidecarbamatos (Carbamoil-N-hidroxi Toxina). (Lagos, 2002).

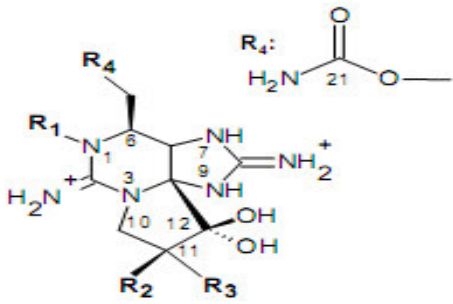
La actividad tóxica de la Saxitoxina reside en el grupo cetona hidratada o dihidroxi del anillo heterocíclico de cinco miembros, actividad que desaparece cuando estos grupos se transforman en monohidroxi por reducción catalítica con hidrógeno. Este grupo hidroxilo activo permite preparar distintos derivados de la STX. Las toxinas VPM son termoestables en pH ácido (salvo los componentes N-sulfo-carbamatos), pero inestables en condiciones alcalinas, oxidándose fácilmente (Mons *et al.*, 1998). Los diferentes grupos de toxinas VPM responden de manera diferente, bajando su potencia o incrementándola al someterlas a temperaturas de 90 °C a 130 °C y pH de 3 a 7. Lo cual indica que un tratamiento térmico para su eliminación no siempre será eficaz y por ende no es acertado (Indrasena *et al.*, 2000).

2.4. Metabolismo de las toxinas VPM en moluscos bivalvos

Ciertas especies de moluscos bivalvos son capaces de efectuar cambios en la molécula de la toxina, por ejemplo, la decarbamoilización enzimática que ocurre en *Protothaca staminea*; otro caso, es el molusco *Mesodema mactroides*, donde se estudió la biotransformación de la Gonyalautoxina (GTX) y/o neo-STX, de poca toxicidad, en la molécula de STX de mayor toxicidad aumentando la toxicidad total en

el bioensayo en ratón (Mons *et al.*, 1998). En algunas especies las biotransformaciones casi no ocurren como en el caso de *Mya arenaria* y *Mitylus edulis* (Bricelj y Shumway, 1998).

Tabla 2. Estructura de Toxinas VPM (Hernández y Gárate, 2006)

Grupo de Toxina		R1	R2	R3
Carbamatos (R ₄ : OCO-NH ₂)	STX	H	H	H
	NEO	OH	H	H
	GTX ₁	OH	OSO ₃	H
	GTX ₂	H	OSO ₃	H
	GTX ₃	H	H	SO ₃
	GTX ₄	OH	H	SO ₃
N-Sulfocarbamatos (R ₄ : OCONH-SO ₃ ⁻)	B ₁	H	H	H
	B ₂	OH	H	H
	C ₃	OH	OSO ₃	H
	C ₁	H	OSO ₃	H
	C ₂	H	H	SO ₃
	C ₄	OH	H	SO ₃
Decarbamatos (R ₄ : OH)	dcSTX	H	H	H
	dcNEO	OH	H	H
	dcGTX ₁	OH	OSO ₃	H
	dcGTX ₂	H	OSO ₃	H
	dcGTX ₃	H	H	SO ₃
	dcGTX ₄	OH	H	SO ₃
Deoxidecarbamatos (R ₄ : H)	doSTX	H	H	H
	doGTX ₂	H	OSO ₃	H
	doGTX ₃	H	H	SO ₃
STX : Saxitoxina NEO : Neo-Saxitoxina GTX : Gonyautoxina Dc : Decarbamatos Do : Deoxidecarbamatos SO₃ : Trióxido de Azufre. R : Radical				

En cuanto a la eliminación de las toxinas VPM. Los bivalvos se clasifican según la cinética de la eliminación de las toxinas, en dos grandes grupos: los que eliminan las toxinas lentamente (por ejemplo *Argopecten purputatus*, *Saxidomus giganteus*, *Spisula solidissima*, *Placopecten magellanicus*, *Patinopecten yessoensis*) y los que lo hacen rápida y moderadamente como por ejemplo los géneros *Aulacomya* y *Mitylus*. En algunos moluscos se puede explicar la cinética de eliminación de las toxinas, siguiendo el modelo bifásico de dos compartimentos, es decir; durante la acumulación, la toxicidad de las vísceras es generalmente entre dos y cinco veces mayor que la de los demás tejidos; siendo los menos tóxicos los el pie y el músculo aductor. Sin embargo, la eliminación de toxinas de las vísceras ocurre más rápidamente que los demás tejidos blandos (músculo, pie, manto, etc.) causando, una disminución uniforme de su contribución a la carga de toxinas total. Esto ocurre porque los órganos digestivos concentran las toxinas en primera instancia, al alimentarse el molusco por filtración, de la misma forma los órganos digestivos pierden la toxicidad acumulada por efecto de la depuración al seguir alimentándose (FAO, 2005).

2.5. Toxicología

2.5.1. Mecanismos de Acción

Las toxinas VPM alteran específicamente el transporte del ion sodio, pues son capaces de unirse fuertemente al canal de sodio dependiente del voltaje, que es una proteína de membrana, implicada en la propagación del potencial de acción, que está presente en casi todas las células de los mamíferos y también en invertebrados como algunos moluscos bivalvos (Hernández y Gárate, 2006).

La mayoría de los moluscos bivalvos son relativamente insensibles a las toxinas VPM. Esto se debe a que muchos de ellos cuentan con nervios y músculos operados principalmente por canales de calcio activados por voltaje, en tanto que las STX y análogos bloquean solo los canales de sodio con mucha afinidad. Esto permite a los

mariscos continuar alimentándose y convertirse en muy tóxicos. El molusco bivalvo *Mytilus edulis*, por ejemplo, puede acumular más de 80 µg STX en menos de una hora debido a su gran tolerancia y a que no deja de alimentarse de algas tóxicas (Mons *et al.*, 1998).

Los canales de sodio dependientes de voltaje tienen un papel muy importante en la generación del potencial de acción, si suficientes canales se abren cuando hay un cambio del potencial de membrana, un pequeño flujo de iones sodio se mueven hacia dentro de la célula (a favor de su gradiente electroquímico) despolarizando la célula. Estos canales participan en la fase ascendente del potencial de acción, permiten la despolarización de la neurona y de los miocitos. La STX y varias otras toxinas VPM bloquean el canal de sodio dependiente del voltaje, disminuyendo o anulando la propagación del potencial de acción, pero sin afectar el canal de potasio, dependiente de voltaje, directamente. El tiempo promedio de bloqueo del canal de sodio depende de la velocidad de disociación y no de la concentración de toxinas, (Mons *et al.*, 1998).

2.5.2. Toxicidad en modelos animales

El ratón es relativamente sensible a las toxinas VPM y es el modelo animal en cual se han realizado el mayor numero de estudios sobre el tema; comparado con otras especies animales, como mamíferos y aves la sensibilidad es variada. (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de dosis letal 50 (DL₅₀) por vía oral en especies animales para Saxitoxina (Mons *et al.*, 1998)

Especie animal	DL₅₀ en µg/kg de peso corporal
<i>Mus musculus</i> (Ratón laboratorio).	260-263
<i>Rattus norvegicus</i> (Rata laboratorio).	277-800
<i>Felis catus</i> (Gato común).	254-280
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Conejo).	181-200
<i>Canis lupus familiaris</i> (Perro).	180-200
<i>Cavia porcellus</i> (Cobayo).	128-135
<i>Columba livia</i> (Paloma).	91-100

Se ha estudiado la acción biológica de al menos el 50 por ciento de los análogos naturales y se han establecido la potencia relativa de estos análogos en ratones (Tabla 4).

Los análogos estudiados muestran que los mecanismos celulares de acción son básicamente los mismos. Algunas toxinas de las VPM como las del grupo de las N-sulfocarbamoil son menos tóxicas que otras; pero en condiciones ácidas fácilmente se convierten en compuestos del grupo carbamoil y en algunos casos la toxicidad aumenta hasta 40 veces, la conversión ocurre en jugos gástricos artificiales de ratón y de rata con un pH de 1,1; pero no en el jugo gástrico natural tamponado a un pH de 2,2 (Mons *et al.*, 1998).

Tabla 4. Toxicidad relativa de Saxitoxina y sus análogos (Mons *et al.*, 1998)

Toxina	Toxicidad Relativa
STX	1
NeoSTX	0,5 – 1,1
GNTX2/3 a	0,39/1,09 – 0,48/0,76
GNTX1/4 a	0,8/0,33 – 0,9/0,9
DcSTX	0,43
dcneoSTX	0,43
B1	0,07 – 0,17
B2	0,07 – 0,09
C1 a C4	<0,01 – 0,14
dcGNTX1 a dcGNTX4	0,18 – 0,45

En la intoxicación con VPM, los efectos en el sistema respiratorio son la causa de la muerte. Esta ocurre por asfixia debido a una parálisis progresiva de los músculos respiratorios (Halstead *et al* 1984). En experimentos con animales (gatos y conejos) una dosis entre 1 y 2 µg STX/kg de peso por vía intravenosa, reduce la frecuencia respiratoria, lo que se refleja como una disminución en amplitud y velocidad. Un aumento de la dosis a 4 o 5 µg STX/kg de peso resulta en dificultades respiratorias serias. La muerte se previene mediante respiración artificial. Si la dosis no es excesiva puede ocurrir que la respiración se restablezca espontáneamente. En los experimentos con animales (gatos y conejos) sólo se observó parálisis periférica por efectos directos en los músculos del sistema respiratorio (Andrinolo *et al* 1999). No se observa inhibición del centro respiratorio del sistema nervioso y los potenciales de acción se envían a los músculos del centro de las costillas y del diafragma. Sin embargo, otros investigadores como Acres y Gray (1978) sugieren una influencia central y no se puede descartar que haya efectos centrales en las neuronas respiratorias. A menudo, la parestesia y la sensación de liviandad están relacionadas con un efecto central, aunque también pueden ser ocasionados por efectos periféricos en el sistema nervioso (Mons *et al.*, 1998).

2.5.3. Toxicidad en seres humanos

La concentración causante de las intoxicaciones por VPM en los seres humanos varía considerablemente. Esto se debe principalmente a diferencias de sensibilidad individuales y a oscilaciones del método de determinación. Se observaron síntomas leves con una ingesta oral entre 144 y 1 660 microgramos equivalente de Saxitoxina por persona (µg eq STX/p) e intoxicaciones fatales por ingerir entre 456 y 12 400 µg eq de STX/p, calculado a partir de los restos de mejillones tóxicos y considerando que estos valores pueden presentar grandes variaciones. En algunos casos, la ingesta oral de 300 µg de toxinas PSP por persona causó la muerte, mientras que en otros casos

se observó la ausencia de síntomas tóxicos luego de una dosis oral de 320 µg de toxinas por persona (Mons *et al.*, 1998).

Según la “Autoridad Alimentaria de Nueva Zelanda y Australia” (ANZFA), en los seres humanos entre 120 y 180 µg de STX/p de toxinas VPM pueden ocasionar síntomas leves, entre 400 y 1060 µg de STX/p pueden ocasionar síntomas más severo y en algunos casos causar muerte; pero dosis entre 2000 y 10000 µg STX/persona muy probablemente sean fatales en la mayoría de los casos (FAO, 2005). La tasa de mortalidad por VPM es muy variable. En brotes recientes en América del Norte y Europa Occidental, con más de 200 personas afectadas, no se registró ninguna muerte. Sin embargo, la tasa de mortalidad de brotes similares en Asia Sudoriental y en América Latina es del 2 al 14 por ciento debido a que las intoxicaciones ocurrieron a menudo en áreas rurales, donde los habitantes y médicos locales nunca habían observado este tipo de envenenamiento (Mons *et al.*, 1998).

2.5.4. Síntomas y tratamiento

Los síntomas del VPM inician aproximadamente de 30 minutos a 3,3 horas de consumir el molusco contaminado. Los primeros síntomas que se presentan son: hormigueo en dedos de manos y pies, dolor de cabeza y mareo; adormecimiento de lengua y labios, esta sensación se esparce a la cara y cuello. Estos efectos son claramente debidos a la absorción local de las toxinas VPM a través de la membrana de la mucosa oral. Algunas veces puede ocurrir náusea y vómito en etapas tempranas. En los casos de envenenamiento moderado, la parestesia progresa hacia los brazos y las piernas, acompañadas de debilidad motora. Una sensación de flotar y ligereza son frecuentes también (Tabla 5). La base de este disturbio no es clara, pero es probablemente atribuido a alguna interferencia con señales propioceptivas aferentes como la conducción de impulsos en nervios sensoriales con mecanismos centrales. Manifestaciones cerebelosas como ataxia, incoordinación motora y dismetría son frecuentes. Los reflejos pueden estar ausentes o normales y la mayoría de los

pacientes están calmados y conscientes. Otros efectos del sistema nervioso autónomo que pueden ocurrir son salivación excesiva, taquicardia y diaforesis (Hernández y Gárate, 2006), (Mons *et al.*, 1998).

Tabla 5. Síntomas clínicos causados por el veneno paralizante de moluscos (Hernández y Gárate, 2006)

Intoxicación leve	Intoxicación moderada	Intoxicación severa
Niveles de STX* 80-120 µg.	120-180 µg.	300 – 1200 µg.
Náusea y vómito	Insuficiencia respiratoria.	Pupilas dilatadas no reactivas
Debilidad muscular	Parálisis músculos faciales.	Distonía profunda
Parestesia en labios	Reflejo nauseoso ausente.	Parálisis respiratoria
Parestesia extremidad inferior	Lengua inmóvil.	Hipotensión, paro cardíaco

*STX: Saxitoxina

2.6. Determinación de Veneno Paralizante de Moluscos (VPM).

2.6.1. Bioensayos

Para la detección de las VPM podemos encontrar dos tipos de bioensayos los llamados ensayos *in vivo*, como el bioensayo en ratón y los ensayos *in vitro* como los ensayos en corte de hipocampo, ensayos con células nerviosas e inmunoensayos enzimáticos (FAO, 2005).

El método del bioensayo en ratón, es el ensayo *in vivo* más usado en los programas de control alrededor del mundo; fue desarrollado por Sommer y Meyer en 1937 (Gibbard y Naubert, 1948). Posteriormente la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) lo refinó y normalizó para contar con un método rápido y confiable para medir el contenido de toxinas VPM totales (AOAC, 2000). El procedimiento consiste en inyectar 1 mL de extracto ácido del marisco a ratones de 20 gramos y registrar el tiempo transcurrido hasta la muerte del animal. Si se trata de extractos muy tóxicos, se diluyen de forma de asegurar que la muerte ocurra en un período de entre cinco y 15 minutos.

La toxicidad de la muestra se expresa en unidades ratón (UR) y se calcula según las curvas de respuesta a las dosis obtenidas con estándares de STX. Una unidad ratón es equivalente a 0,18 µg de STX aproximadamente con variaciones aceptables de hasta el 20% y se define como la cantidad de toxina inyectada por vía intraperitoneal que causa la muerte de un ratón de 20 g en 15 minutos (FAO, 2005).

Algunas sustancias pueden causar interferencia en la determinación de la concentración como, por ejemplo, un elevado contenido de sal en la muestra, produce interferencias al inhibir los efectos tóxicos; mientras que la presencia de altas concentraciones de zinc en los extractos, puede producir la muerte en ratones con síntomas muy similares a los producidos por la toxina; pero en tiempo de muerte (Tm) por encima de los 15 minutos. (Fernandez *et al.*, 2002).

Las dificultades prácticas que presenta este método son: se necesita contar con una colonia de ratones de entre 19 y 22 g de peso; el límite de detección del ensayo varía según la cepa; la relación entre el tiempo de muerte y la concentración de toxinas no es lineal; la determinación exacta del tiempo hasta la muerte es muy trabajosa y conlleva el sacrificio de un gran número de animales.

A pesar de las dificultades mencionadas, el bioensayo en ratón se utiliza para cuantificar la presencia de toxinas VPM en diversas especies de moluscos, crustáceos y equinodermos, siendo el método oficial en la mayoría de los países que cuentan con reglamentación para toxinas VPM en estos productos marinos. Anualmente se desarrollan ensayos interlaboratorios con el fin de garantizar la calidad de los bioensayos como los que realiza el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (CRLMB) de la Unión Europea y el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) en ambos casos los resultados de los participantes se comparan con el valor de referencia, se calcula la media y la desviación estándar descartándose los resultados anómalos es decir aquellos que superen 3 veces la desviación estándar. Se consideran concordantes aquellos que estén dentro de este rango, de manera que se puede evaluar si el laboratorio participante obtiene resultados confiables (Delgado, 2009; AESAN, 2010).

2.6.2. Ensayos *in vitro*

Para la detección de las toxinas VPM podemos encontrar dos tipos de ensayos *in vitro*, los ensayos funcionales (ensayos en corte de hipocampo y ensayos en células nerviosas) y los no funcionales (Inmunoensayos enzimáticos) (FAO, 2005).

Para los ensayos en corte de hipocampo se utilizan preparaciones *in vitro* de cortes de hipocampo de rata como una forma de detectar, rápida y específicamente, la presencia de toxinas de algas marinas, como la saxitoxina (STX), en tejido de moluscos bivalvos. Para esto se identifican las propiedades electro-fisiológicas

específicas de cada toxina siendo útiles para detectar y analizar las biotoxinas marinas en tejido de mariscos contaminados. En los ensayos en células nerviosas se, estudia el mecanismo mediante el cual las toxinas VPM alteran el funcionamiento celular. Las toxinas se unen a los canales de sodio de las membranas de las células nerviosas, alterando la despolarización normal. La toxicidad es proporcional a la cantidad de toxina unida radiomarcada en una preparación de cerebro de rata. Otros ensayos utilizan células de neuroblastoma de ratón con adición de ouabaina con veratridina, que aumenta la entrada del ión sodio, estas células se hinchan y se lisan; la STX, al bloquear los canales de sodio, inhibe la actividad de estos dos compuestos. La fracción de células no afectadas por la ouabaina y la veratridina es directamente proporcional a la concentración de STX y de sus análogos (FAO, 2005). El principal problema para la aplicación de ensayos *in vitro* funcionales en los programas de control sanitario es la escasa disponibilidad comercial de toxinas puras y de materiales contaminados de concentración certificada, lo que dificulta los procesos de validación de los ensayos y su posterior implementación en los laboratorios de control (Fernandez *et al.*, 2002).

El principal inconveniente para adoptar los ensayos *in vitro* no funcionales como los ensayos inmunológicos en el control sanitario de las biotoxinas es la falta de respuesta de algunas toxinas, el desconocimiento de las reacciones cruzadas y la dificultad de obtener una correlación satisfactoria entre la reacción inmunológica y la toxicidad real de las muestras; la ventaja de estos ensayos esta, en su fácil aplicación, por ejemplo en la forma de bastoncillos (*sticks*), hacen que puedan estos ser fácilmente utilizados para hacer análisis cualitativos o semicuantitativos en el campo, sin necesidad de trasladar las muestras al laboratorio (Fernandez *et al.*, 2002).

En la actualidad existen *sistemas* de detección para toxinas VPM, llamados también *Kits* de detección, comercialmente disponibles como por ejemplo el «*Rida-screen Saxitoxin*» (R-BiopharmGmbH, Darmstadt, Alemania) y el *Jellett rapid testing kit for*

PSP (Jellett Biotek). El primero, el kit de *RIDA-screen Saxitoxin* es un ELISA directo competitivo. El límite de detección del ensayo para la saxitoxina es de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. La reactividad cruzada es buena para STX, GTX2 y GTX3 siendo muy pobre en el caso de neo STX, GTX1, GTX4 y toxinas decarbamoiladas, de manera que en el caso de que estas toxinas estén presentes en las muestras se produce una subestimación de la toxicidad. En el otro sistema el "*Jellett rapid testing kit for PSP*" para la detección de VPM está basado en técnicas de inmunocromatografía de flujo lateral y contiene una mezcla de anticuerpos, producidos a partir de diferentes análogos. Está diseñado en un formato muy sencillo y fácil de usar, para ser utilizado como método de *screening*, proporcionando una indicación cualitativa (positivo/negativo) a la presencia de toxinas VPM. La STX, GTX 2-3, GTX5 y dc STX son detectables en concentraciones por debajo del límite regulatorio de $80 \mu\text{g STX eq. /100g}$. En el caso de Neo- STX, GTX1 y GTX4, su sensibilidad es muy pobre. Debido a las diferentes afinidades de la mezcla de anticuerpos hacia los análogos individuales y dependiendo del perfil tóxico, el límite de detección es variable, por esta razón el CEFAS (*The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Sciences, UK*) dejó de utilizarlas de manera oficial para sus programas de monitoreo durante el 2007 (CEFAS, 2007).

2.6.3 Análisis Químicos

2.6.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC (del inglés *High performance liquid chromatographic*) es la técnica de determinación para VPM más utilizada, además del bioensayo en ratón. Las STX y sus análogos no tienen cromóforos y por tanto no puede ser detectado con detectores de luz visible, luz ultra violeta (UV-LV) o un detector de fluorescencia (FLD); es necesario convertirlas por un proceso llamado derivatización en una molécula que pueda serlo. Existen 2 metodologías, ambas convierten a un producto fluorescente a las toxinas (derivatización) pudiendo ser Pre-

Columna o Post-Columna, dependiendo si se derivatiza antes o después de la corrida cromatográfica. Para el cálculo final de cantidad de toxina contenida en la muestra cada análogo se multiplica por un factor de Toxicidad relativa con respecto a la STX, esto hace comparable este resultado con el calculado por el bioensayo en ratón. En la actualidad existen dos métodos oficiales, el CEN 14526 (método pre-columna) y el CEN 14194 (método post columna), cada uno con sus ventajas y desventajas; pero en ambos casos estos tienen mayor sensibilidad (10 a 80 ug/Kg) que el bioensayo en ratón (alrededor de 300 ug/Kg). El inconveniente es que se debe contar con cada uno de los estándares correspondientes a los análogos de la STX además de necesitar un personal especializado. A pesar de lo descrito anteriormente, en la actualidad se considera al bioensayo en ratón como método de referencia y los métodos por HPLC como alternativos (EFSA, 2009).

2.6.3.2 Espectrometría de masas

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a detector de masas más conocida como LC-MS, ha sido usada para la determinación de las toxinas del grupo de la saxitoxina, sin embargo el ancho de los picos y la baja intensidad iónica de las moléculas de los análogos de la saxitoxina, conlleva a límites de detección relativamente altos y una limitada reproducibilidad, la cual restringe el uso de esta técnica como rutina. Usando los métodos de extracción y limpieza de la muestra de la AOAC, el límite de detección para la saxitoxina está alrededor de los 100 ug STX 2HCl/ Kg. Últimamente se han realizado modificaciones en la preparación del extracto y en la preconcentración de la muestra, resultando límites de detección muchos más bajos (STX: 23-42 ug STX 2HCl/Kg). En conclusión, su ventaja está en la especificidad, la información individual de los perfiles completos para el grupo de la saxitoxinas en la muestra ensayada; además de que no se necesita derivatizar la muestra, con lo cual los perfiles de los análogos no se modifican. La desventaja está en que, la técnica es costosa y solo se puede cuantificar algunos grupos, puesto que

no todos los estándares se encuentran disponibles de manera comercial, falta aun validar la técnica y al igual que las técnicas del HPLC, el cálculo de la toxicidad se realiza con factores de equivalencia, para poder ser comparable al bioensayo en ratón (EFSA, 2009).

2.7. Distribución mundial y situación actual en el Perú

Hasta 1970, sólo se tenía conocimiento de floraciones en Europa, América del Norte y Japón. Veinte años más tarde se registran a lo largo de todo el hemisferio sur, en Sudáfrica, Australia, India, Tailandia, Brunei Darussalam, Sabah (Malasia), las Filipinas y en Papua Nueva Guinea (Hallegraeff *et al.*, 2003).

En Italia durante la década de los noventa, se registraron mareas rojas de manera recurrente, pero a pesar de la presencia de especies de microalgas potencialmente tóxicas, como *Alexandrium spp*, no se registró intoxicación de VPM en humanos. En los últimos años se ha detectado la presencia de toxinas VPM relacionadas a *Alexandrium minitum* y *Alexandrium catenella* con concentraciones superiores a 80 µg eq de STX/100g hasta 2510 µg eq de STX/100g; siendo con Portugal los países europeos con mayor concentraciones de toxinas VPM, puesto que es este ultimo donde se han registrado la mayor concentración que fue de 9145 µg eq de STX/100g en 1993 (FAO, 2005).

España, principal exportador de moluscos bivalvos a toda Europa, es donde se han desarrollado los mayores esfuerzos y estudios científicos, específicamente en la región de Galicia, donde se han reportado diversos incidentes de VPM. En 1976 moluscos procedentes de España causaron intoxicación alimentaria en Alemania, Francia, Suiza e Italia con un total de 120 personas afectadas aunque sin casos fatales. En el año 2002 ocurrieron eventos tóxicos asociados a toxinas VPM que resultaron en la prohibición de extraer bivalvos en la UE. En ciertas zonas de cultivo los niveles de

toxinas llegaron hasta 1170 µg eq de STX/100g; siendo relacionadas a la presencia de *Alexandrium minitum*, *Alexandrium catenella* y *Gymnodinium catenatum* (FAO, 2005)

El continente Africano también reporta la presencia de toxinas VPM. Sudáfrica registro 17 casos a principios de los años 80, de intoxicación humana por VPM; siendo dos de ellos fatales, esto ocurrió por el consumo de *Chloromytilus meridionales*, con una concentración de 8400 µg eq de STX/100g (FAO, 2005). En noviembre de 1994, en Marruecos se detectó la presencia de VPM; se reportaron concentraciones de aproximadamente 6000 µg eq de STX/100g de carne en *Mytilus galloprovincialis* esto fue relacionado a la presencia de *Gymnodinium catenatum* (Taleb *et al.*, 2003).

El 15 de junio de 1793 en la costa oeste de los Estados Unidos, cerca de Canadá, se registró el primer caso de intoxicación humana por consumo de mariscos, y es descrito por el capitán George Vancouver en "*A Voyage of Discovery to the North Pacific Ocean, and Round the World*" publicado en 1798. En Junio de 1990, se presentó un evento que alcanzó concentraciones de 244000 y 4280 µg eq de STX/g en mariscos crudos y cocidos, respectivamente; siendo las concentraciones más altas que se hayan registrado para esta parte del continente americano. Entre 1980 y 1995 la FDA documento 106 incidentes con 538 casos humanos, 32 de los cuales fueron fatales (FAO, 2005). Desde 1972, casi todos los años se producen brotes de VPM en Maine, New Hampshire y Massachussets, ya que una vez que una floración masiva introduce los quistes de *Alexandrium*, estos permanecen en el agua. Siendo los más importantes los cinco brotes de VPM producidos entre mayo y junio de 1994, con 12 personas afectadas, cuatro de las cuales fueron sometidas a respiración artificial, y una de ellas murió. La mayoría había ingerido moluscos de las especies *Mytilus edulis* o *Mytilus californianus* (FAO, 2005).

En Sudamérica (Tabla 6), al sur de Chile y Argentina, las toxinas VPM se han asociado a floraciones de *A. catenella* en el Canal Beagle, y a floraciones de *A. tamarense* en las costas del Atlántico sur, hasta Uruguay. En 1980, en la Península de Valdés se registró la primera floración tóxica de *A. tamarense*. Luego de este episodio se reportó la muerte de dos miembros de la tripulación de un barco por ingerir mejillones contaminados (Compagnon *et al.*, 1998).

Chile presenta numerosos episodios de intoxicación por VPM, por ejemplo en las regiones X, XI y XII entre 1972 y 2002 se registraron 412 casos de VPM, 30 de los cuales fueron fatales al ingerir *Aulacomya ater* y *Mytilus chilensis* con toxinas VPM en niveles de 2600 y 99000 UR/100 g. Uno de los últimos eventos ocurrió en marzo de 2002 con una muerte y al menos diez casos de intoxicación por consumo de mariscos provenientes de la región de Chiloé. Los registros más altos de VPM en los mariscos coinciden con los periodos en que se registraron las mayores abundancias de *Alexandrium catenella*, estos corresponden a los años 1998, 2000 y 2002. El nivel máximo de toxicidad detectado en Chiloé ocurrió en el 2002 y fue de 29524 µg STX eq./100 g que es el segundo más alto en el historial de VPM en Chile, pues el más alto fue registrado en Estero Critalco en el año 1998 con 99000 µg STX eq./100 g (FAO, 2005 ; Rivera, 2009).

En nuestro país, el estudio de las toxinas VPM al igual que las toxinas marinas en general es muy incipiente, no se tienen registros de casos de intoxicación humana con toxinas VPM y existen pocos registros de zonas con presencia de VPM. Según SANIPES desde el 2007 hasta el 2010, se han registrado pocos eventos VPM. De los datos publicados se tienen 9 eventos importantes los cuales señalan concentraciones de hasta 151 µg STX eq. /100 g en una ocasión en la bahía de Samanco - Ancash, mientras que, en los eventos restantes alrededor de 80 µg STX eq./100; los departamentos involucrados son Ica, Lima, Ancash, La Libertad y Piura. En el departamento de Lima, exactamente en el Callao y en Ancón se produjeron en total

dos eventos, cabe mencionar que la información obtenida no está completamente documentada pues no se encontró, en los documentos revisados, las concentraciones de las toxinas VPM, suponiendo en este caso valores por debajo del límite reglamentario para el consumo humano. (Flores , 2009; Woolcott , 2009; SANIPES, 2010a) (Tabla 7).

En cuanto al estudio de microalgas tóxicas, el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) desde hace ya varios años viene realizando monitoreos en nuestro litoral, uno de estos últimos se llevó a cabo en Chincha y Pisco en el 2005 como parte de un proyecto piloto, registrando especies como *Pseudo-nitzschia*, *Dinophysis caudata*, *D. acuminata*, *D. tripos* y *D. rotundata* y en forma ocasional *Alexandrium* (Sánchez *et al.*, 2008).

Se tienen registros de mareas rojas en algunas zonas de nuestro país como el caso de Lambayeque, en el cual en enero del 2004 hasta abril del 2007 ocurrieron diversos eventos de mareas rojas, pero ninguna de ellas fue producida por microalgas tóxicas, salvo la del 06 de mayo 2004 producida por *Alexandrium peruvianum* cuya toxigenicidad se discute puesto que se necesitan estudios de los perfiles químicos de las toxinas que produce esta microalga para poder ser concluyentes (Bances , 2009).

El SANIPES dentro de su “Programa de Monitoreo de Fitoplancton Tóxico” en coordinación con IMARPE, lleva a cabo el monitoreo de diversas zonas de nuestro litoral, además de parámetros microbiológicos. También, se llevan a cabo análisis de biotoxinas marinas (como las VPM) en el recurso que se quiera extraer, dentro de este ámbito se llevó a cabo hasta marzo del 2008 un estudio en la bahía de Ancón registrando la presencia de géneros de algas nocivas como *Alexandrium* y *Gymnodinium* de las que muchas de sus especies son causantes de biotoxinas VPM pero no se detectó la presencia de VPM en los mariscos analizados en ese momento (SANIPES, 2010a). Estos géneros de dinoflagelados potencialmente tóxicos fueron anteriormente reportados para nuestras costas por el IMARPE en los años noventa (Zevallos y Cadernas, 2005). Un hecho importante ocurrió en Playón-Ica en el 2008,

donde se registró la concentración de fitoplancton potencialmente tóxico más alta hasta la fecha, se reportó *Gymnodinium sp.* en una concentración de 2'352'000 N° Cel/L motivo por el cual se cerró la zona. La autoridad sanitaria analizó los moluscos extraídos en las semanas contiguas pero ninguna muestra dio presencia de VPM y el cierre se mantuvo por cerca de un mes originando grandes pérdidas económicas (SANIPES, 2008). En cuanto a la normativa que regula los niveles de toxina VPM en moluscos bivalvos para el consumo humano, muchos países han adoptado normativas que considera las toxinas como un grupo, con límites establecidos en 400 UR/100 g (unidades ratón por gramo) o 80 µg eq de STX/100 g (microgramos equivalentes de Saxitoxinas por 100 gramos). Casi toda la reglamentación hace referencia a los mariscos o moluscos bivalvos en general (FAO, 2005).

Los países en desarrollo, exportan principalmente moluscos bivalvos a la Unión Europea (UE), por tanto adoptan sus normas de acuerdo a sus exigencias. El caso de nuestro país no es diferente y hemos adoptado los límites y métodos de detección que exige la UE (SANIPES, 2009; SANIPES, 2010b).

El reglamento CE N° 853/2004 establece el límite de las toxinas VPM para moluscos bivalvos en 80 µg eq de STX/100 g de carne ó 800 µg de STX2HCl/Kg. El método de análisis oficial es el bioensayo en ratón de la AOAC, al que puede asociarse un método químico de detección, si fuera necesario. El reglamento CE N° 2074/2005 indica que en caso de discrepancia sobre los resultados, el método de referencia deberá ser el bioensayo en ratón.

Tabla 6. Principales especies microalgales asociadas a eventos tóxicos en el Cono Sur Americano (Reguera, 2002)

TOXINA	ESPECIE	DISTRIBUCION	COMENTARIO
VPM (Veneno Paralizante de Moluscos)	<i>Alexandrium catenella</i>	Sur de Chile (regiones X-XII) canal de Beagle.	Principal agente de episodios de VPM en Chile. Víctimas humanas
	<i>Alexandrium tamarense</i>	Argentina (Mar del plata y Patagonia) y Uruguay.	Principal agente de VPM en Argentina y Uruguay. Víctimas humanas.
	<i>Alexandrium fraterculus</i>	Sur de Brasil, estuario de la plata	Sospechoso de causar episodios en Uruguay. Toxicidad no demostrada.
	<i>Gymnodinium catenatum</i>	Sur de Brasil y Uruguay, norte de Argentina	Episodios moderados de VPM en Uruguay y Argentina
Toxinas Lipofílicas (Veneno diarreico de moluscos)	<i>Dinophysis acuta</i>	Fiordos chileno	Principal agente de Toxinas Lipofílicas en Chile.
	<i>Dinophysis acuminata</i>	Todo el Cono Sur	Asociado a Toxinas Lipofílicas en Uruguay, Brasil y norte de Argentina
	<i>Dinophysis caudata</i>	Sur de Brasil, Uruguay	Asociado a Toxinas Lipofílicas en Brasil y Uruguay
ASP (Toxina Amnésica)	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	Chile, norte de Argentina	Episodios de ASP en Chile y asociado a ASP en Argentina
	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Todo el Cono Sur	Toxinas detectadas en cultivos de cepas chilenas

Tabla 7. Eventos de veneno paralizante de moluscos en el Perú 2004-2009 (Woolcott, 2009; Flores, 2009; SANIPES, 2010a).

Año	Molusco	Género/Especie relacionada	Estación / Lugar	µg STX eq./100 g
2004	<i>Argopecten purpuratus</i>	-----	Atenas – ICA (CERPER)	-----
2007 (junio)	<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>Alexandrium sp.</i> , <i>Gymnodinium sp.</i>	Lima-Callao (SANIPES)	100
2007	<i>Ensis sp.</i>	-----	Ancón – Lima (CERPER)	-----
2008	<i>Donax sp.</i>	-----	Morrope - Lambayeque	-----
2009 (18-Abril)	<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>Alexandrium sp.</i> , <i>Gymnodinium sp.</i>	Ancash - Bahía Samanco	82
2009 (21-Abril)	<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>Alexandrium sp.</i> , <i>Gymnodinium sp.</i>	Ancash - Bahía Samanco	90
2009 (23-Abril)	<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>Alexandrium sp.</i> , <i>Gymnodinium sp.</i>	Ancash - Bahía Samanco	151
2009	<i>Argopecten purpuratus</i>	-----	Piura-Bayóvar (CERPER)	-----

III.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Moluscos bivalvos como *Aulacomya ater* y *Argopecten purpuratus* provenientes del litoral central peruano, pueden contener veneno paralizante de moluscos (VPM) en niveles detectables por bioensayos en ratón.

3.2 OBJETIVOS GENERALES

Determinar la presencia de veneno paralizante de moluscos (VPM) en *Aulacomya ater* (choro) y *Argopecten purpuratus* (concha de abanico) del litoral peruano y centros de abastos del departamento de Lima.

3.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar el método biológico del bioensayo en ratón AOAC - 2005 (cepa Swiss) para la determinación de Veneno Paralizante de Mariscos (VPM).
- Detectar y cuantificar los niveles de contaminación de VPM en *Aulacomya ater* y *Argopecten purpuratus* expendidos en el Terminal Pesquero del Callao.
- Detectar y cuantificar los niveles de contaminación por VPM en *Aulacomya ater* y *Argopecten purpuratus* en el Desembarcadero Pesquero Artesanal de Ancón (mercado informal), entre los meses de octubre del 2008 a marzo del 2009.
- Relacionar la existencia en el litoral peruano de toxinas VPM con la presencia de fitoplancton tóxico, para las áreas monitoreadas por el programa de control de moluscos bivalvos del Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES), durante los años 2008 y 2009.

IV.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Lugar de muestreo

Los especímenes fueron adquiridos en dos puntos de muestreo, el Terminal Pesquero de Ventanilla y el Desembarcadero Pesquero Artesanal de Ancón.

La elección se hizo en base a dos criterios básicos, la ubicación y el origen de la extracción de los moluscos que se expendían. El Terminal Pesquero de Ventanilla es un mercado mayorista que recibe especies hidrobiológicas que incluyen a moluscos que provienen de casi todo el litoral norte de nuestro país; y desde aquí se distribuyen a otros mercados minoristas de Lima y Callao. Se encuentra ubicado en el distrito de Ventanilla a la altura del Km 5,2 carretera a Ventanilla.

El Desembarcadero Pesquero Artesanal de Ancón está situado a 43 Km. al norte de Lima, en el distrito de Ancón, y los moluscos que se expenden son extraídos de la misma zona por pescadores artesanales, siendo el consumo de estos mariscos básicamente por la población local. Las zonas de extracción del recurso son Isla Farito (11°46'50.81"S, 77°11'52.04"O), Islote Cocharcas (11°47'9.00"S, 77°12'6.10"O) e Islote la Ofrenda (11°46'54.10"S, 77°11'51.93"O).

Los bioensayos y la preparación de las muestras se llevaron a cabo en dos sedes, el Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos y en los laboratorios del Servicio de Control de Calidad de la Universidad Cayetano Heredia.

4.2. Materiales:

4.2.1. Material Biológico

4.2.1.1 Moluscos bivalvos

Se muestrearon 2 especies de moluscos bivalvos, *Aulacomya ater* (choro común) y *Argopecten purpuratus* (concha de abanico). Cabe señalar que las muestras en estudio para concha de abanico no llegaban a la talla comercial que es, mayor a 65 mm de longitud, lo mismo sucedía para el choro común cuya talla comercial, es de 7,5 a 9,5 cm como señala IMARPE.

4.2.1.2 Ratones Swiss

Para la realización del Bioensayo se utilizó la cepa de ratón Swiss procedente del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), los especímenes utilizados fueron ratones machos de 4 semanas aproximadamente con peso entre 18 y 21 g.

4.2.1.3 Estandar de Saxitoxina

Para la preparación de la curva patrón y cálculo del Factor de Conversión (FC) se utilizó la Saxitoxina producida por *Food y Drug Administration* (FDA) la cual tiene una concentración de 100 µg/mL. Con esta se preparó una solución patrón de trabajo a una concentración de 1µg/mL.

4.2.2. Datos sobre Fitoplancton Potencialmente Tóxico

Se consideraron los reportes semanales y quincenales del monitoreo del fitoplancton potencialmente tóxico (FPT) que emite el Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) a través del Programa de Control Sanitario del Medio Ambiente Acuícola , se evaluaron los reportes de los años 2008 y 2009. Se realizó una base de datos utilizando el programa Microsoft Office Excel 2007. La información se organizó según

el polígono de procedencia (áreas de bancos naturales delimitadas por varias estaciones de muestreo), se realizaron tablas y gráficas con las especies de fitoplancton potencialmente tóxico y número de células por litro reportado para cada polígono estudiado, se consideró la estación que tenía el mayor reporte de fitoplancton semanal o quincenal, de cada polígono. Se escogieron 4 estaciones a lo largo de nuestro litoral para el análisis de los reportes de FPT las cuales fueron en primer lugar Ancón, por ser el principal punto de muestreo del presente estudio y las otras tres fueron Huacho, Samanco y Paracas por tener datos de manera continua entre el 2008 y 2009.

4.3 Metodología

4.3.1 Muestreo de moluscos bivalvos

El muestreo se realizó una vez por semana desde el mes de octubre del 2008 a Marzo del 2009, en los lugares establecidos, de la siguiente manera: 12 individuos de cada especie, en cada lugar de muestreo, haciendo un total de 48 individuos de cada especie. El transporte se realizó, inmediatamente después de cada muestreo, hasta el laboratorio en cadena de frío (5 °C aproximadamente) (**Figura 2**). Las muestras se rotularon con una etiqueta consignando: especie, lugar de muestreo, fecha, hora.



Figura 2. Transporte de muestras al laboratorio

4.4. Determinación de Veneno Paralizante de Moluscos

Se siguió la metodología de AOAC para la determinación del Veneno Paralizante de Moluscos (Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action, Official Method of analysis 959.08 del año 2000).

4.4.1. Preparación de la curva patrón y cálculo del Factor de Conversión (FC)

Se prepararon alícuotas de 10:10, 10:15, 10:20, 10:25 y 10:30 (Saxitoxina: agua) a partir de la solución patrón de trabajo de 1 μg /mL., se inoculó por vía intraperitoneal dosis de 1 mL de las diferentes diluciones hasta que se determinó aquella dilución que tuviera una mediana en los Tiempo de muerte (T_m), entre 5 y 7 min. El pH de las diluciones se ajustó a 3. Adicionalmente, se ensayó diluciones que se diferenciaron en 1 mL de agua destilada de la dilución que proporcionó un T_m entre 5 y 7 min, obteniéndose 3 diluciones, inoculándose con estas 1 grupo de 10 ratones, con cada una de las diluciones anteriormente mencionadas. La dosis de 1 mL fue inyectada á cada uno de los 3 ratones y se determinó el T_m , que se define como, el tiempo transcurrido desde la finalización de la inoculación hasta la última respiración del ratón. El ensayo se repitió dos días después, utilizando las diluciones anteriormente preparadas, incluyendo las que difieren en ± 1 mL de agua destilada. Una semana después se repitió el ensayo por completo. Se calculó la mediana de T_m para cada grupo de 10 ratones utilizados con cada dilución. Si todos los grupos de 10 ratones inoculados con cualquier dilución daban medianas de $T_m < 5$ o > 7 min, se descartaban los resultados de esta dilución en los cálculos posteriores. A partir de la mediana del T_m de cada grupo de 10 ratones para cada una de las diluciones seleccionadas, se determinó el valor de la Unidad Ratón (UR) utilizando la tabla de *Sommer* (Anexo 3 y 4). Se dividió los μg de STX mL^{-1} calculados por las UR mL^{-1} para obtener el FC, que expresa los μg equivalentes de STX para una UR. Se calculó el promedio de los valores FC considerando a este el FC final (Anexo 1).

4.4.2. Preparación de la muestra

Las muestras congeladas, fueron descongeladas bajo chorro de agua evitando sumergir, realizándose una limpieza de la parte externa de la valva con un cepillo para sacar las algas u otros elementos adheridos. La parte blanda se separó de la valva, para ello se corto el músculo aductor con una tijera; se extrajo aproximadamente 500 gramos de músculo y gónada y se homogeneizó en una licuadora convencional (Anexo 2).

4.4.3 Extracción de la toxina

Se pesaron 100 g del homogenizado en un vaso de precipitado (previamente tarado), se añadió 100 mL de HCl 0,1 N agitando constantemente. El pH se ajustó a 3. Luego en plancha calefactora se llevó a ebullición ($100 \pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 5 min. Después se enfrió en baño de agua y se transfirió el homogenizado a una probeta graduada enrazando hasta 200 mL con HCl 0,1 N. El pH se volvió a ajustar a 3 y se centrifugó durante 5 minutos a 3000 RPM. Se recuperó el sobrenadante para continuar con el bioensayo (Anexo 2).

4.4.4 Bioensayo en el ratón

Se inoculó por vía intraperitoneal un grupo 3 ratones por cada bioensayo, cada ratón fue inoculado con 1 mL de extracto ácido. Se anotó el tiempo de inicio de la inoculación y se observó el comportamiento de los ratones para estimar el T_m , este se determinó por el último movimiento respiratorio (boqueada) del ratón (**Anexo 2**).

4.4.5 Cálculo de la toxicidad

Se determinó el T_m de cada uno de los ratones utilizados en el ensayo, incluyendo, los supervivientes. Se procedió a calcular las UR correspondientes utilizando la Tabla de *Sommer* (Anexo 3). Se Consideró que el T_m de los ratones supervivientes en cada

ensayo ($T_m > 60$ min) equivalía a 0.875 unidades de ratón (UR). Se corrigió las UR obtenidas para cada ratón multiplicando la corrección del peso de ese ratón obtenido en la Tabla de corrección de peso (Anexo 4). Después, se calculó la mediana de las UR corregidas (URC).

Las URC se convirtieron en toxinas equivalentes, expresada como $\mu\text{g STX eq. /100 g}^{-1}$ de carne mediante la fórmula:

$$\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1} = \text{URC} \times \text{FC} \times \text{FD} \times 200.$$

Donde:

- $\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$ Microgramos de Saxitoxina equivalente en 100 gramos.
- URC: UR corregidas.
- FC: Factor de conversión.
- FD: Factor de dilución.

4.5 Diseño y Análisis estadísticos de los resultados.

Siendo el alcance de la presente tesis de investigación de carácter descriptivo, los datos obtenidos fueron sometidos a estadísticos descriptivos simples, utilizando el software Microsoft Excel 2007, se calcularon medidas de tendencia central y valores porcentuales (Wayne, 1996).

V. RESULTADOS

5.1 Estandarización del Bioensayo

La estandarización del bioensayo en ratón para la cepa de ratón Swiss y el cálculo del límite de cuantificación, se realizó según el procedimiento establecido en el mismo método AOAC 959.08 del año 2000, para toxinas VPM. En el desarrollo de la estandarización se encontró en primera instancia que la dilución de la solución madre que dio Tm entre 5 y 7 minutos, fue la 10/15 lo cual equivale a 0,4µg/mL de STX , las otras que quedaron fuera del rango de trabajo no fueron consideradas como indica el método (Tabla 8).

De las 3 diluciones de la solución patrón, 2 dieron tiempos de muerte entre 5 y 7 min, 10/14 y 10/15 que corresponden a 0,416 µg/mL y 0,4µg/mL de STX respectivamente (Tabla 9 y Tabla 10), la dilución 10/16 dio un tiempo de muerte menor a 5 minutos por lo cual se descartó en el cálculo final (Tabla 11).

Todos los pasos anteriormente mencionados se repitieron una vez más, dando como resultado tiempos de muerte similares a los anteriores (Tabla 12). En esta repetición se obtuvieron 3 FC parciales que correspondían a las diluciones 10/14,10/15 y 10/16; pues estas diluciones dieron tiempos de muerte entre 5 y 7 min (Tabla 13, Tabla 14 y Tabla 15). Como paso final se promediaron cinco resultados, los dos del primer bioensayo y los tres de la repetición (Tabla 16 y 17). Obteniéndose un FC promedio de 0,2148 que es el FC final para el bioensayo. Para efectos prácticos se considera al FC con solo 3 dígitos es decir 0,215. El valor del FC se utilizó para calcular el límite de cuantificación que resultó ser de 37,6 µg STX /100g, para este cálculo se considera el valor de UR de 0,875 que corresponde a un tiempo de muerte mayor o igual a 60 minutos de un ratón de 20 g de peso y se multiplica por 200 (volumen total en la extracción) (Tabla 18).

5.2 Muestras ensayadas

En los bioensayos realizados para la detección de toxinas VPM en *Aulacomya ater* y *Argopecten purpuratus* adquiridos en el Terminal Pesquero de Ventanilla, no se encontraron niveles detectables de toxina. Se programaron 24 muestreos semanales, de los cuales solo se muestreo en 21 ocasiones para *Aulacomya ater* y 20 para *Argopecten purpuratus*; esto debido a la escasez del recurso (Tabla 19 y 20). En el mercado “Desembarcadero Pesquero Artesanal de Ancón”, de los 24 muestreos semanales programados, se muestrearon 21 semanas para *Aulacomya ater* y 17 semanas para *Argopecten purpuratus*. No se encontraron niveles detectables de VPM en concha de abanico, caso contrario ocurrió con *Aulocomya ater*, pues en esta especie se encontraron niveles detectables en tres muestras que correspondieron a la semana 4, semana 5 y semana 14 de muestreo. En las semanas 4 y 5 se obtuvieron concentraciones de 38 $\mu\text{g STX eq. } 100\text{g}^{-1}$ de manera consecutiva. En la semana 14 que corresponde a la primera semana de enero se pudo detectar una concentración de 48 $\mu\text{g STX eq. } 100\text{ g}^{-1}$ siendo esta última la más alta (Tabla 19 y 20). En cualquier caso ninguno de los 3 resultados positivos sobrepasaron el límite permisible de 80 $\mu\text{g STX eq. } 100\text{ g}^{-1}$ (Figura 3).

5.3 Datos sobre Fitoplancton Potencialmente Tóxico

Según los monitoreos para fitoplancton potencialmente tóxico de la Bahía de Ancón realizado desde el 10 de enero hasta el 21 de marzo del 2008, se hicieron un total de 8 muestreos (Figura 3). En los dos meses de monitoreo, los reportes, indican la presencia de 2 especies relacionadas a VPM como son *Alexandrium sp.* y *Gymnodinium sp.* siendo esta última la que se encuentra en mayor concentración, registrando un pico máximo de 8920 N° Cel/L, en la cuarta semana de monitoreo. Por otro lado *Alexandrium sp.* registró picos máximos en la tercera y cuarta semana de muestreo de 200 Cel/L. Las temperaturas superficiales del mar para esta zona se mantuvieron normales en enero y febrero (entre 16 y 17 °C) en tanto que para marzo

estuvieron hasta 4 °C por encima del promedio normal que es de 17 °C según lo determinado por IMARPE- UPRSIG. En la estación Huacho se estudiaron los datos desde enero a setiembre del 2008, siendo *Gymnodinium sp.* la microalga que presentó las concentraciones celulares más altas, llegando hasta 155000 N° Cel/L en enero y luego 51000 N° Cel/L en febrero , mientras que *Alexandrium sp.* siempre se mantuvo por debajo de 400 N° Cel/L (Figura 4). Las temperaturas superficiales del mar registradas entre enero y febrero estuvieron dentro de lo normal, 16 y 17 °C respectivamente; en marzo se incrementó hasta 5°C por encima del promedio normal llegando hasta 22°C según los registros de IMARPE-UPRSIG.

En la estación de Samanco desde octubre del 2008 hasta diciembre del 2009 (Figura 5), se pudo observar que *Gymnodinium sp.* fue a lo largo de los primeros 7 meses de monitoreo la especie que se mantuvo en número muy superior con respecto a *Alexandrium sp.*, llegando a alcanzar picos de 2080 Cel/L , en octubre del 2008 y un pico máximo de 8040 Cel/L en Junio del 2009. En la primera quincena de abril del 2008 *Alexandrium sp.* registró 4080 Cel/L mientras que *Gymnodinium sp.* registró 640 Cel/L. Cabe también mencionar que después de Junio del 2009 no se registró la presencia de *Gymnodinium sp.* en los muestreos; pero si *Alexandrium sp.* que no sobrepasó las 600 Cel/L. Las temperaturas superficiales en junio del 2009, donde se registraron picos máximos, estuvieron dentro de lo normal para esta zona siendo alrededor de 19°C según el IMARPE-UPRSIG.

En la estación de Paracas, *Gymnodinium sp.* alcanzó un pico máximo de 5200 Cel/L en el mes de marzo a diferencia de *Alexandrium sp.* que para ese mismo mes no sobrepasó las 400 Cel/L. Cabe destacar que en el mes anterior, *Alexandrium sp.* alcanzó hasta los 4500 Cel/L y no se encontró *Gymnodinium sp.* (Figura 6). En el mes de marzo donde se alcanzaron los picos más altos de FPT la temperatura se mantuvieron normales siendo esta alrededor de 23 °C según el IMARPE-UPRSIG.

Tabla 8. Cálculo del factor de conversión (FC) ⁽¹⁾

Ratón	Peso	Dilución del estándar ⁽²⁾	Síntomas observados	Tm ⁽³⁾	Mediana
1	21,0	0,5 µg/mL (1:1) 10/10	Salto, paro respiratorio.	04'30'	2
2	21,0		Salto, paro respiratorio.	04'25'	1
3	21,0		Salto, paro respiratorio.	05'05'	5
4	20,8		Salto, paro respiratorio.	04'50'	4
5	21,0		Salto, paro respiratorio.	04'30'	3
1	19,2	0,4 µg/mL (1:1,5) 10/15	Salto, paro respiratorio.	05'36'	3
2	19,0		Salto, paro respiratorio.	05'15'	1
3	20,2		Salto, paro respiratorio.	05'30'	2
4	21,2		Salto, paro respiratorio.	05'49'	4
5	20,0		Salto, paro respiratorio.	06'21'	5
1	20,8	0,33 µg/mL (1:2) 10/20	Salto, paro respiratorio.	08'01'	4
2	20,8		Salto, paro respiratorio.	06'13'	2
3	20,8		Postración.	> 15'	5
4	20,0		Salto, paro respiratorio.	07'35'	3
5	19,0		Salto, paro respiratorio.	05'54'	1
1	21,0	0,28 µg/mL (1:2,5) 10/25	Postración.	> 15'	5
2	21,0		Salto, paro respiratorio.	07'00'	2
3	20,8		Salto, paro respiratorio.	12'00'	3
4	19,0		Salto, paro respiratorio.	06'21'	1
5	20,0		Postración.	> 15'	4
1	21,0	0,25 µg/mL (1:3) 10/30	Salto, paro respiratorio.	13'20'	5
2	20,8		Salto, paro respiratorio.	06'25'	2
3	19,2		Salto, paro respiratorio.	06'06'	1
4	20,0		Salto, paro respiratorio.	07'20'	3
5	21,0		Salto, paro respiratorio.	08'49'	4

(1) Solución Madre estándar: 100 µg/mL, Cepa de Ratones: Swiss.

(2) Solución estándar de trabajo: 1 µg/mL.

(3) Tiempo de muerte.

Tabla 9. Cálculo del factor de conversión (FC), dilución estándar 0,41666 µg/mL.

Ratón	Peso	Síntomas observados	Tm	Mediana
1	19,4	Salto, paro respiratorio.	05' 10'	6
2	19,2	Salto, paro respiratorio.	05' 20'	7
3	19,0	Salto, paro respiratorio.	04' 40'	3
4	19,0	Salto, paro respiratorio.	05' 50'	8
5	19,4	Salto, paro respiratorio.	06' 30'	9
6	19,8	Salto, paro respiratorio.	04' 41'	4
7	19,0	Salto, paro respiratorio.	05' 05'	5
8	19,6	Salto, paro respiratorio.	04' 38'	1
9	19,0	Salto, paro respiratorio.	04' 39'	2
10	19,2	Postración.	> 15'	10

Tabla 10. Cálculo del factor de conversión (FC), dilución estándar 0,4000 µg/mL.

Ratón	Peso	Síntomas observados	Tm	Mediana
1	20,0	Postración.	> 15'	10
2	20,0	Salto, paro respiratorio.	06' 00'	9
3	19,6	Salto, paro respiratorio.	05' 00'	5
4	19,6	Salto, paro respiratorio.	05' 50'	8
5	19,6	Salto, paro respiratorio.	05' 20'	6
6	19,2	Salto, paro respiratorio.	05' 45'	7
7	19,0	Salto, paro respiratorio.	04' 00'	1
8	19,8	Salto, paro respiratorio.	04' 18'	2
9	19,4	Salto, paro respiratorio.	04' 28'	3
10	20,0	Salto, paro respiratorio.	04' 28'	4

Tabla 11. Cálculo del factor de conversión (FC) dilución estándar 0,3846 µg/mL.

Ratón	Peso	Síntomas observados	Tm	Mediana
1	19,4	Salto, paro respiratorio.	05' 10'	7
2	19,2	Salto, paro respiratorio.	05' 20'	8
3	19,0	Salto, paro respiratorio.	04' 40'	3
4	19,0	Salto, paro respiratorio.	04' 50'	5
5	19,4	Salto, paro respiratorio.	06' 30'	9
6	19,8	Salto, paro respiratorio.	04' 41'	4
7	19,0	Salto, paro respiratorio.	05' 05'	6
8	19,6	Salto, paro respiratorio.	04' 38'	1
9	19,0	Salto, paro respiratorio.	04' 39'	2
10	19,2	Postración.	> 15'	10

Tabla 12. Cálculo del factor de conversión (FC) (repetición) ⁽¹⁾.

Ratón	Peso	Dilución del estándar ⁽²⁾	Síntomas observados	Tm ⁽³⁾	Mediana
1	21,0	0,5 µg/mL (1:1) 10/10	Salto, paro respiratorio.	05' 15'	4
2	20,6		Salto, paro respiratorio.	05' 13'	3
3	20,6		Postración.	> 15'	5
4	20,6		Salto, paro respiratorio.	04' 56'	2
5	19,2		Salto, paro respiratorio.	04' 00'	1
1	19,6	0,4 µg/mL (1:1,5) 10/15	Salto, paro respiratorio.	05' 37'	2
2	19,0		Salto, paro respiratorio.	06' 08'	4
3	19,4		Salto, paro respiratorio.	05' 09'	1
4	19,2		Postración.	> 15'	5
5	19,6		Salto, paro respiratorio.	05' 40'	3
1	18,8	0,33 µg/mL (1:2) 10/20	Salto, paro respiratorio.	07' 20'	5
2	19,6		Salto, paro respiratorio.	06' 59'	4
3	19,2		Postración.	05' 23'	1
4	19,2		Salto, paro respiratorio.	06' 13'	3
5	19,4		Salto, paro respiratorio.	06' 10'	2
1	19,6	0,28 µg/mL (1:2,5) 10/25	Postración.	07' 40'	3
2	20,6		Salto, paro respiratorio.	07' 00'	2
3	20,4		Salto, paro respiratorio.	6' 58'	1
4	20,4		Postración.	> 15'	4
5	19,2		Postración.	> 15'	5
1	19,8	0,25 µg/mL (1:3) 10/30	Salto, paro respiratorio.	09' 20'	3
2	19,0		Salto, paro respiratorio.	06' 30'	1
3	19,2		Salto, paro respiratorio.	13' 10'	4
4	21,0		Postración.	> 15'	5
5	20,8		Salto, paro respiratorio.	08' 20'	2

(1) Solución Madre estándar: 100 µg/mL, Cepa de Ratones: Swiss.

(2) Solución estándar de trabajo: 1 µg/mL.

(3) Tiempo de muerte.

Tabla 13. Cálculo del factor de conversión (FC) dilución estándar 0,41666 µg/mL (repetición).

Ratón	Peso	Síntomas observados	Tm	Mediana
1	20,0	Saltos, paro respiratorio.	05' 20'	7
2	21,0	Postración.	> 15'	10
3	19,8	Saltos, paro respiratorio.	05' 29'	4
4	21,0	Saltos, paro respiratorio.	05' 10'	6
5	20,2	Saltos, paro respiratorio.	05' 25'	8
6	20,0	Saltos, paro respiratorio.	04' 24'	1
7	20,6	Saltos, paro respiratorio.	04' 27'	2
8	20,2	Saltos, paro respiratorio.	04' 29'	3
9	21,0	Saltos, paro respiratorio.	04' 50'	5
10	20,2	Saltos, paro respiratorio.	04' 30'	4

Tabla 14. Cálculo del factor de conversión (FC) dilución estándar 0,400 µg/mL (repetición).

Ratón	Peso	Síntomas observados	Tm	Mediana
1	21,0	Saltos, paro respiratorio.	05' 08'	4
2	21,0	Postración.	> 15'	10
3	20,4	Saltos, paro respiratorio.	06' 24'	7
4	20,2	Saltos, paro respiratorio.	04' 56'	3
5	20,4	Saltos, paro respiratorio.	05' 30'	6
6	19,6	Saltos, paro respiratorio.	04' 53'	2
7	21,0	Saltos, paro respiratorio.	07' 23'	8
8	21,0	Postración.	> 15'	9
9	20,4	Saltos, paro respiratorio.	03' 49'	1
10	20,4	Saltos, paro respiratorio.	05' 20'	5

Tabla 15. Cálculo del factor de conversión (FC) dilución estándar 0,3846 µg/mL (repetición).

Ratón	Peso	Síntomas observados	T. muerte	Mediana (T)
1	19,4	Salto, paro respiratorio.	03' 57'	2
2	21,2	Salto, paro respiratorio.	04' 30'	4
3	20,2	Salto, paro respiratorio.	05' 05'	6
4	19,2	Postración.	> 15'	9
5	19,8	Postración.	> 15'	10
6	19,4	Salto, paro respiratorio.	06' 00'	8
7	19,2	Salto, paro respiratorio.	03' 51'	1
8	20,6	Salto, paro respiratorio.	04' 10'	3
9	19,8	Salto, paro respiratorio.	04' 56'	5
10	21,0	Salto, paro respiratorio.	05' 57'	7

Tabla 16. 1er Cálculo parcial del factor de conversión (FC)

Datos	Dilución del estándar ⁽¹⁾	Dilución del estándar ⁽²⁾	Dilución del estándar ⁽³⁾
	0,41666µg STX.	0,400µg STX.	0,3846µg STX.
Mediana del T. muerte.	04' 58'	05' 20'	05' 50'
UR del T. muerte.	2,0	1,8	1,92
URc = UR x C. peso			
Factor de Conversión (FC)			
$FC = \frac{\mu g STx \text{ de la dilucion}}{URc}$	0,2083	0,2222	0,2003

(1) Tabla 9. (2) Tabla 10. (3) Tabla 11.
STX: saxitoxina

Tabla 17. 2do Cálculo parcial del factor de conversión (FC).

Datos	Dilución del estándar ⁽¹⁾	Dilución del estándar ⁽²⁾	Dilución del estándar ⁽³⁾
	0,4166µg STX	0,400µg STX	0,3846µg STX
Mediana del T.muerte	05' 03'	05' 40'	05' 03'
UR del T.muerte	1,902	1,690	1,902
URc = UR x C. peso			
Factor de Conversión (FC)			
$FC = \frac{\mu g STx \text{ de la dilucion}}{URc}$	0,21906	0,2367	0,2022

(1) Tabla.13 (2) Tabla.14 (3) Tabla.15
STX: saxitoxina

Tabla 18. Cálculo del FC final y del límite de cuantificación

FC PROMEDIO	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)
FC= 0,2148	$LC = URC \times FC \times 200$ $LC = 0.875 \times 0.215 \times 200 = 37,6 \mu g STx eq / 100g$

STX: saxitoxina

Tabla 19. Veneno paralizante de moluscos (VPM) en *Argopecten purpuratus* (concha de abanico) evaluados semanalmente.

ANCON				VENTANILLA			
Sm	Fecha	T. muerte	$\mu\text{g STX}$ eq./100 g	Sm	Fecha	T. muerte	$\mu\text{g STX}$ eq./100 g
1	05/10/08	> 00:60:00	< 37	1	05/10/08	> 00:60:00	< 37
2	12/10/08	> 00:60:00	< 37	2	12/10/08	> 00:60:00	< 37
3	19/10/08	> 00:60:00	< 37	3	19/10/08	> 00:60:00	< 37
4	26/10/08		ND	4	26/10/08	> 00:60:00	< 37
5	02/11/08	> 00:60:00	< 37	5	02/11/08	> 00:60:00	< 37
6	09/11/08		ND	6	09/11/08	> 00:60:00	< 37
7	16/11/08		ND	7	16/11/08		ND
8	23/11/08	> 00:60:00	< 37	8	23/11/08	> 00:60:00	< 37
9	30/11/08	> 00:60:00	< 37	9	30/11/08	> 00:60:00	< 37
10	07/12/08		ND	10	07/12/08	> 00:60:00	< 37
11	14/12/08	> 00:60:00	< 37	11	14/12/08	> 00:60:00	< 37
12	21/12/08	> 00:60:00	< 37	12	21/12/08	> 00:60:00	< 37
13	28/12/08		ND	13	28/12/08		ND
14	04/01/09	> 00:60:00	< 37	14	04/01/09	> 00:60:00	< 37
15	11/01/09	> 00:60:00	< 37	15	11/01/09	> 00:60:00	< 37
16	18/01/09	> 00:60:00	< 37	16	18/01/09	> 00:60:00	< 37
17	25/01/09	> 00:60:00	< 37	17	25/01/09	> 00:60:00	< 37
18	01/02/09		ND	18	01/02/09		ND
19	08/02/09	> 00:60:00	< 37	19	08/02/09	> 00:60:00	< 37
20	15/02/09	> 00:60:00	< 37	20	15/02/09	> 00:60:00	< 37
21	22/02/09	> 00:60:00	< 37	21	22/02/09	> 00:60:00	< 37
22	01/03/09	> 00:60:00	< 37	22	01/03/09	> 00:60:00	< 37
23	08/03/09		ND	23	08/03/09		ND
24	15/03/09	> 00:60:00	< 37	24	15/03/09	> 00:60:00	< 37

Sm: semana ND: no determinado

Tabla 20. Veneno paralizante de moluscos (VPM) en *Aulacomya ater* (choro común) evaluados semanalmente.

ANCON				VENTANILLA			
Sm	Fecha	T. muerte	$\mu\text{g STX}$ eq./100 g	Sm	Fecha	T. muerte	$\mu\text{g STX}$ eq./100 g
1	05/10/08	> 00:60:00	< 37	1	05/10/08	> 00:60:00	< 37
2	12/10/08	> 00:60:00	< 37	2	12/10/08	> 00:60:00	< 37
3	19/10/08	> 00:60:00	< 37	3	19/10/08		ND
4	26/10/08	00:50:01	38	4	26/10/08	> 00:60:00	< 37
5	02/11/08	00:55:00	38	5	02/11/08	> 00:60:00	< 37
6	09/11/08	> 00:60:00	< 37	6	09/11/08	> 00:60:00	< 37
7	16/11/08	> 00:60:00	< 37	7	16/11/08	> 00:60:00	< 37
8	23/11/08	> 00:60:00	< 37	8	23/11/08	> 00:60:00	< 37
9	30/11/08		ND	9	30/11/08	> 00:60:00	< 37
10	07/12/08	> 00:60:00	< 37	10	07/12/08	> 00:60:00	< 37
11	14/12/08	> 00:60:00	< 37	11	14/12/08	> 00:60:00	< 37
12	21/12/08	> 00:60:00	< 37	12	21/12/08	> 00:60:00	< 37
13	28/12/08		ND	13	28/12/08		ND
14	04/01/09	00:08:43	48	14	04/01/09	> 00:60:00	< 37
15	11/01/09	> 00:60:00	< 37	15	11/01/09	> 00:60:00	< 37
16	18/01/09	> 00:60:00	< 37	16	18/01/09	> 00:60:00	< 37
17	25/01/09	> 00:60:00	< 37	17	25/01/09	> 00:60:00	< 37
18	01/02/09	> 00:60:00	< 37	18	01/02/09	> 00:60:00	< 37
19	08/02/09	> 00:60:00	< 37	19	08/02/09	> 00:60:00	< 37
20	15/02/09	> 00:60:00	< 37	20	15/02/09	> 00:60:00	< 37
21	22/02/09	> 00:60:00	< 37	21	22/02/09		ND
22	01/03/09	> 00:60:00	< 37	22	01/03/09	> 00:60:00	< 37
23	08/03/09		ND	23	08/03/09	> 00:60:00	< 37
24	15/03/09	> 00:60:00	< 37	24	15/03/09	> 00:60:00	< 37

Sm: semana ND: no determinado

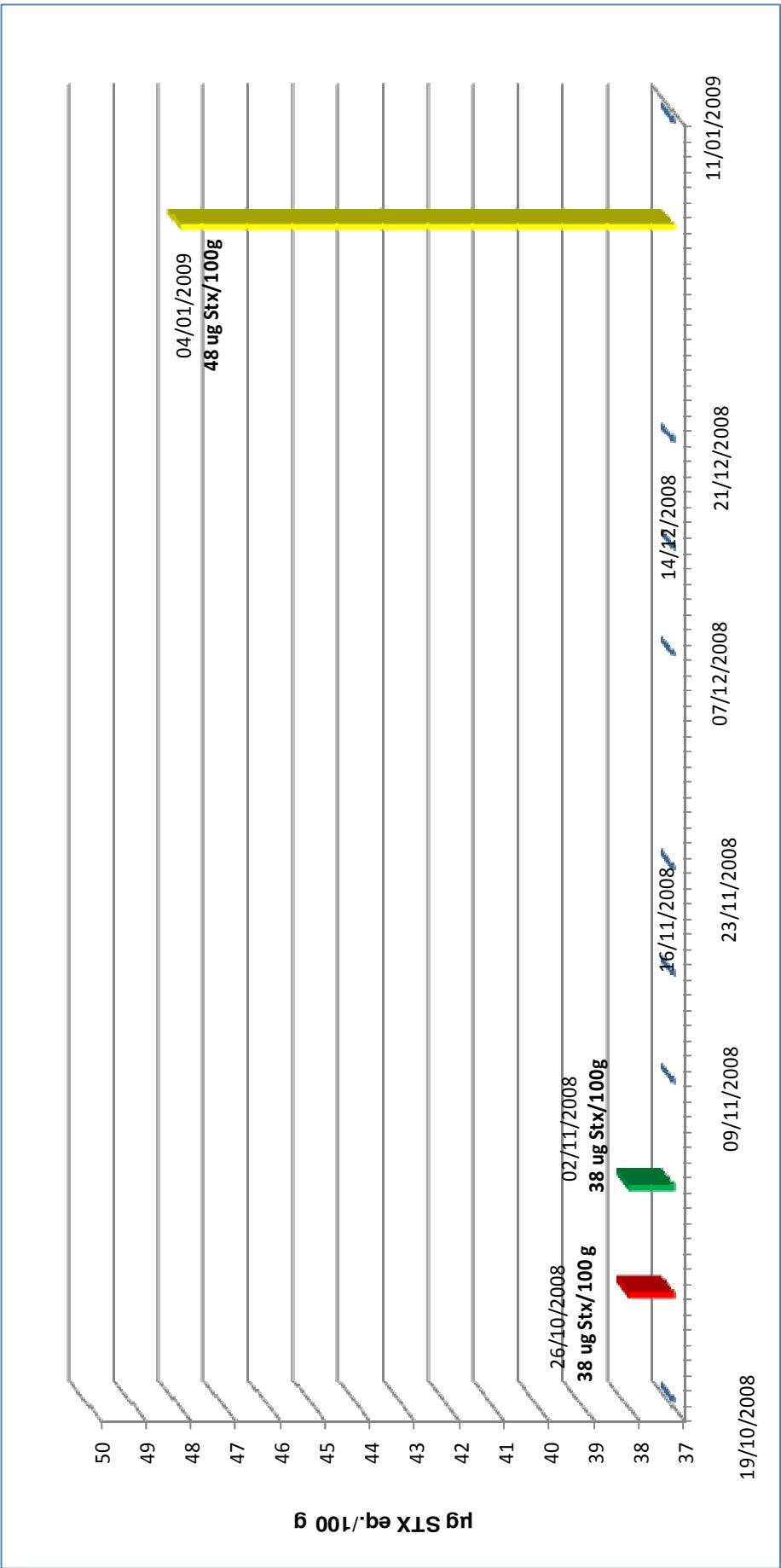


Figura 3. Presencia de toxinas VPM en *Aulacomya ater* comercializados en la localidad de Ancón (zonas de extracción del recurso identificadas como Isla Farito, Islote Cocharcas e Islote la Ofrenda (2008 y 2009).

Tabla 21. Fitoplancton potencialmente tóxico en la zona de extracción de Ancón*.

Fecha	<i>Alexandrium</i> sp.	<i>Gymnodinium</i> sp.	<i>Dinophysis caudata.</i>	<i>Dinophysis acuminata</i>	<i>Dinophysis rotundata</i>	<i>Pseudo-nitzschia cf. delicatissima</i>	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.
10/01/2008	0	0	160	80	0	0	0	0
24/01/2008	0	1080	0	80	0	120	0	0
31/01/2008	200	520	0	40	40	0	0	0
13/02/2008	200	8920	0	0	0	0	0	0
20/02/2008	40	360	40	0	0	0	0	0
05/03/2008	0	0	0	0	0	221000	800	40000
11/03/2008	0	720	360	120	40	372000	0	2720
19/03/2008	0	720	0	0	0	41000	640	0

*Muestreos realizados por el SANIPES.

Nota: la concentración esta en N° células / L.

Tabla 22. Fitoplancton potencialmente tóxico en la zona de extracción de Huacho*.

Fecha	<i>Alexandrium</i> sp.	<i>Gymnodinium</i> sp.	<i>Dinophysis</i> caudata	<i>Dinophysis</i> acuminata	<i>Dinophysis</i> rotundata	<i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>delicatissima</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> <i>pungens</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.
11/01/2008	0	0	0	160	0	1800	0	0
25/01/2008	40	155000	0	40	0	160	160	0
31/01/2008	120	320	40	0	0	0	0	0
08/02/2008	360	40	0	40	0	0	0	0
14/02/2008	40	51000	0	0	0	0	0	0
21/02/2008	0	14000	3280	80	80	80	0	0
29/02/2008	0	320	0	0	0	80	0	0
06/03/2008	0	0	200	0	80	29000	0	840
13/03/2008	0	760	80	0	0	1152000	0	6480
19/03/2008	0	0	80	0	0	68000	0	0
31/03/2008	0	1080	0	0	0	904000	21000	0
11/04/2008	0	2240	0	0	0	880	4240	0
25/04/2008	0	0	0	0	0	0	8080	0
08/05/2008	0	480	40	0	0	0	5760	200
22/05/2008	0	0	0	0	0	160	0	640
13/06/2008	0	0	0	0	0	80	640	0
24/06/2008	0	0	160	120	40	10720	800	0
05/08/2008	0	0	0	0	0	40	0	0
15/08/2008	0	0	0	0	0	1840	280	0
02/09/2008	0	0	0	0	0	240	0	0

*Muestreos realizados por el SANIPES.

Nota: la concentración esta en N° células / L.

Continúa...

Tabla 22. Fitoplancton potencialmente tóxico en la zona de extracción de Huacho (Continuación...)

Fecha	<i>Alexandrium</i> sp.	<i>Gymnodinium</i> sp.	<i>Dinophysis</i> caudata	<i>Dinophysis</i> acuminata	<i>Dinophysis</i> rotundata	<i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>delicatissima</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> <i>pungens</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.
16/09/2008	0	0	0	0	0	1640	0	120
25/09/2008	0	0	0	0	0	560	160	0

*Muestras realizados por el SANIPES.

Nota: la concentración esta en N° células / L.

Tabla 23. Fitoplancton potencialmente tóxico en la zona de extracción de Samanco*.

Fecha	<i>Alexandrium</i> sp.	<i>Gymnodinium</i> sp.	<i>Dinophysis</i> caudata	<i>Dinophysis</i> acuminata	<i>Dinophysis</i> rotundata	<i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>delicatissima</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> <i>pungens</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.
01/10/2008	0	960	40	0	0	40000	5920	454000
14/10/2008	80	2080	280	80	80	2918000	124000	0
29/10/2008	0	360	40		0	2216000	708000	114000
12/11/2008	0	480	40	40	0	1600	640	720
26/11/2008	0	40	40	160	0	1680	560	640
10/12/2008	0	80	240	0	0	78800	960	520
09/01/2009	280	1400	960	3280	160	0	0	80
14/01/2009	0	160	4080	5920	160	240	0	0
20/01/2009	80	80	5120	2360	140	0	0	0
27/01/2009	0	0	9812	1602	178	0	0	0
03/02/2009	0	160	40018	2520	489	1040	840	320
10/02/2009	0		4692	5344	320	0	0	0
17/02/2009	40	160	472	320	16	240	1600	640
24/02/2009	0	220	240	140	16	0	1840	0
03/03/2009	0	80	16328	160	24	0	240	0
11/03/2009	0	0	232	24	18	0	0	0
17/03/2009	0	0	216	160	0	0	440	0
24/03/2009	200	640	66	0	0	0	1440	0
01/04/2009	4080	320	320	120	40	240	680	0
17/04/2009	640	2480	40		20	116114	5680	0

*Muestras realizados por el SANIPES.

Nota: la concentración esta en N° células / L.

Continúa...

Tabla 23. Fitoplancton potencialmente tóxico en la zona de extracción de Samanco (Continuación...)

Fecha	<i>Alexandrium</i> sp.	<i>Gymnodinium</i> sp.	<i>Dinophysis</i> caudata	<i>Dinophysis</i> acuminata	<i>Dinophysis</i> rotundata	<i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>delicatissima</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> <i>pungens</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.
21/05/2009	60	6760	240	160	40	2480	2040	0
01/06/2009	440	8040	240	0	0	440	0	40
03/06/2009	480	800	480	0	0	7540	4640	760
21/07/2009	160	0	280	0	0	48160	125160	1080
03/08/2009	480	0	480	0	0	7540	4643	760
18/08/2009	200	0	360	20	0	880	1360	0
01/09/2009	60	0	620	20	0	1960	3220	0
15/09/2009	20	0	160	40	0	440	0	1760
01/10/2009	0	0	40	20	0	0	0	0
19/10/2009	560	0	40	0	0	1520	1600	0
03/11/2009	0	0	760	720	40	369445	480	0
24/11/2009	0	0	880	320	0	78414	320	0
02/12/2009	120	0	240	160	40	41469	2480	0
17/12/2009	0	0	200	80	0	240	1880	0

*Muestras realizados por el SANIPES.

Nota: la concentración esta en N° células / L.

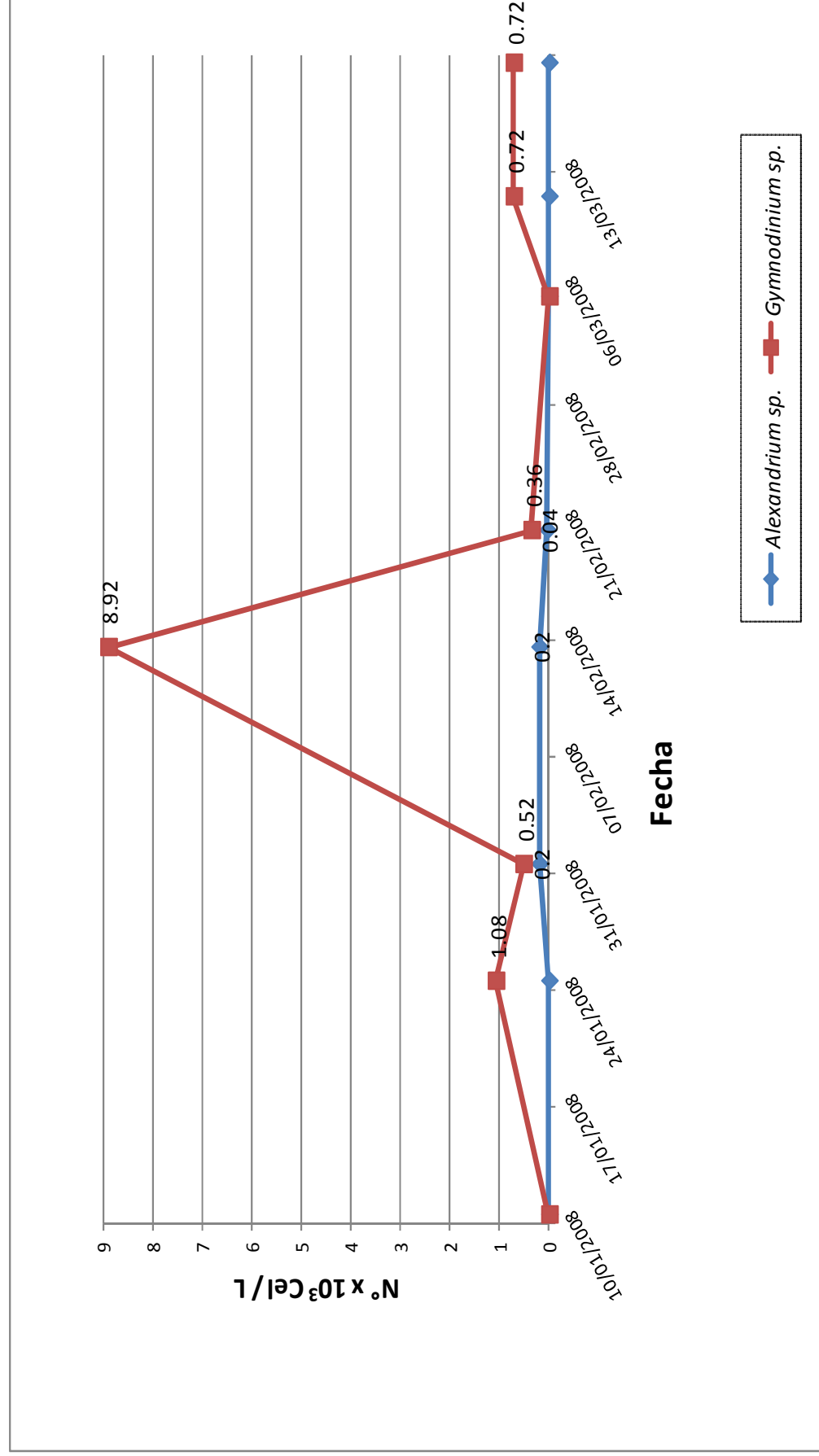


Figura 4. Fitoplancton potencialmente tóxico relacionado a toxinas VPM en Ancón.

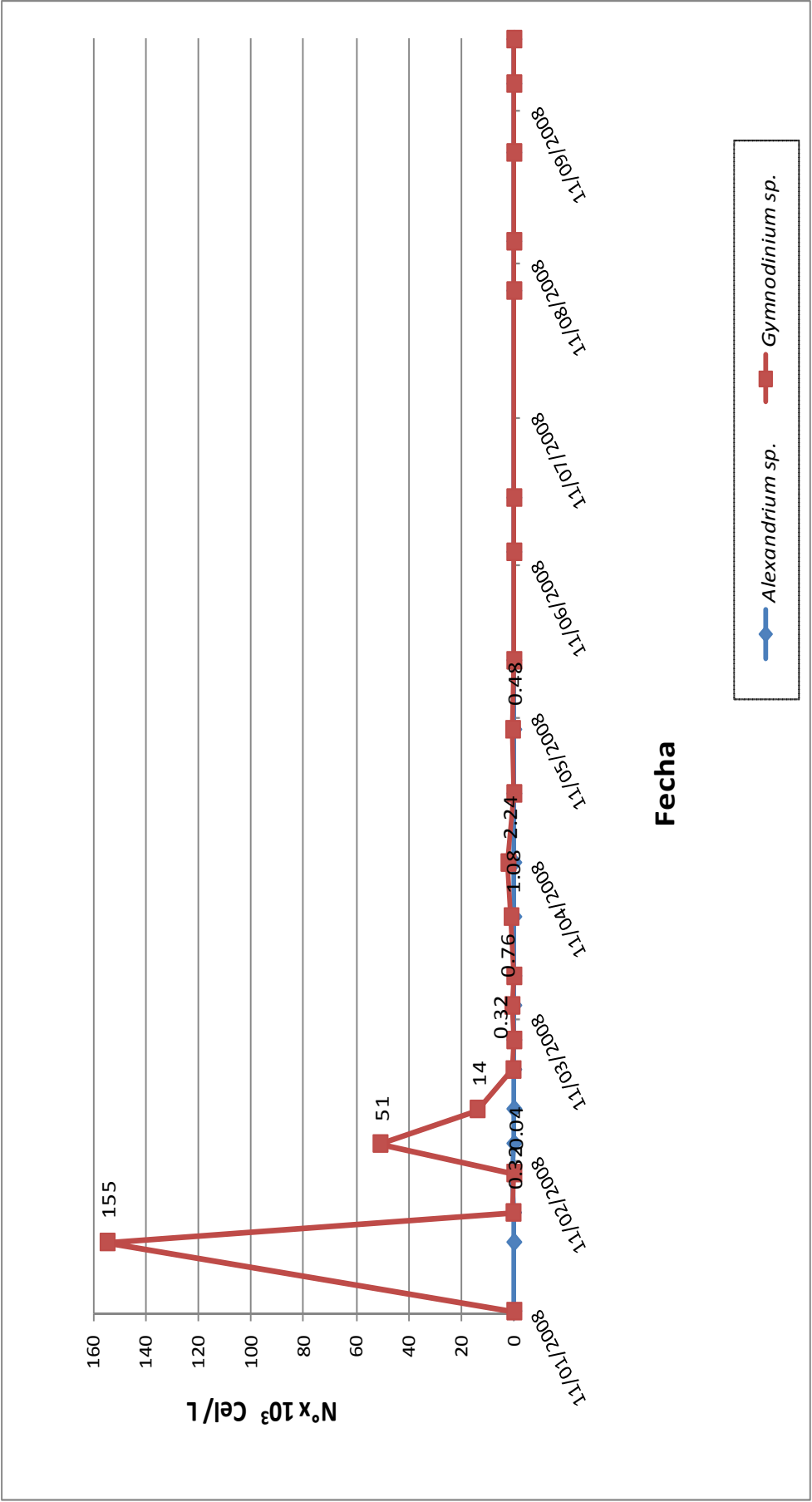


Figura 5. Fitoplancton potencialmente tóxico relacionado a toxinas VPM en Huacho.

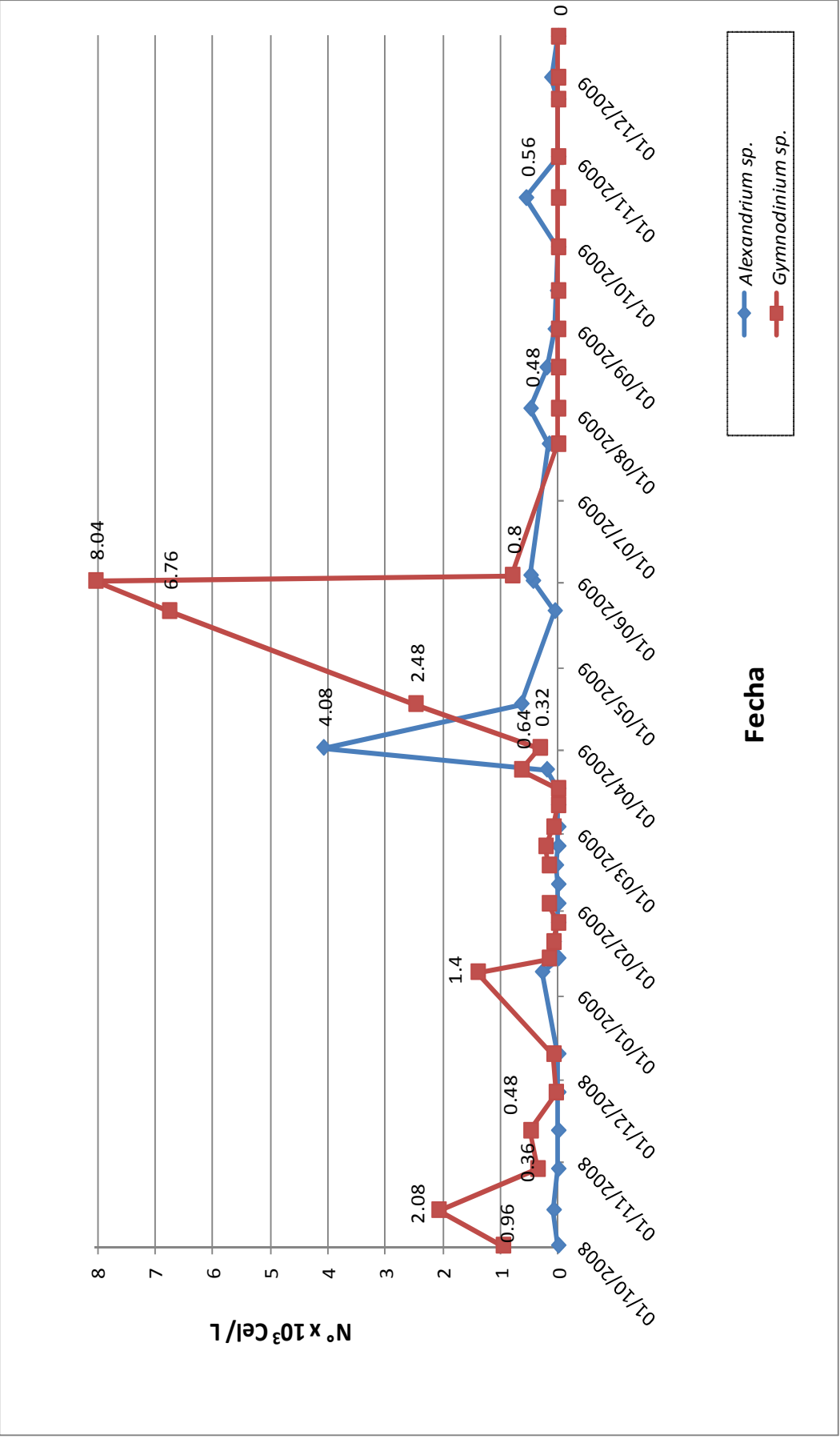


Figura 6. Fitoplancton potencialmente tóxico relacionado a toxinas VPM en Samanco.

VI. DISCUSIÓN

El método para la detección de toxinas VPM de la AOAC indica el procedimiento para determinar un factor de corrección (FC) que es intrínseco de la cepa de ratón utilizada, este FC convierte a la UR en cantidad de saxitoxina (STX); con este procedimiento se consigue determinar el límite de cuantificación (LC) es decir la cantidad mínima cuantificable de manera confiable. Fernández *et al* (2002) menciona que el límite de cuantificación del ensayo puede variar aproximadamente entre 32 y 58 $\mu\text{g STX}/100\text{ g}^{-1}$. El presente bioensayo tuvo como límite de detección 37 $\mu\text{g STX}/100\text{ g}^{-1}$ situándose dentro de este rango; se podría obtener un límite de cuantificación más bajo, utilizando ratones de menor peso como lo indica el protocolo de validación según el Biological Methods-Validation Protocol, publicado por el CRLMB en el 2007; pero indica también, estimarlo según las características frecuentes de los especímenes usados, en nuestro caso ratones cepa Swiss de 20 g en promedio. La metodología de la AOAC encierra como criterio para el aseguramiento de la calidad la verificación del FC, en el presente trabajo la verificación del FC solo se realizó por cada lote de ratones utilizados por lo cual se redujo el número de verificaciones evitando el sacrificio innecesario de especímenes.

En las muestras analizadas del “Mercado de pescadores artesanales de Ancón” si bien es cierto que se tuvieron resultados positivos en *Aulocomya ater* estos no sobrepasaron los límites legales, 80 μg de STX eq. 100 g^{-1} , siendo los tiempos de muerte superiores a los 7 minutos. En este sentido la metodología señala que los Tiempos de muerte (T_m) deben estar entre 5 y 7 minutos pues solo en este rango la curva de concentración STX vs T_m es lineal. El valor más alto obtenido en nuestro estudio que fue de 48 μg de STX eq. 100 g^{-1} en realidad se debe interpretar como un resultado que está entre 30 y 58 $\mu\text{g STX eq. } 100\text{ g}^{-1}$ ($\pm 20\%$ de incertidumbre). Este resultado solo se produjo en una semana de muestreo la semana siguiente no se pudo muestrear el recurso por lo cual no se tiene el dato para saber si aumentó o disminuyó

pero dado que la semana subsiguiente no se detectó VPM, podemos deducir que lo detectado fue el pico mayor de acumulación de la toxina, pues *Aulocomya ater* es capaz de acumular rápidamente la toxina y también perderla de la misma forma, tal como señala Andrinolo *et al.*, (1999), el cual demuestra la depuración natural de toxinas VPM, clasificando a *Aulocomya ater* como depurador rápido. La aparición de las toxinas VPM en Ancón es esporádica y de baja intensidad, esto en el caso de *Argopecten purpuratus* explica que no hubo el tiempo suficiente para que el molusco adquiriera niveles detectables por el método del bioensayo en ratón. No se tiene indicios de que los resultados positivos se deban a interferencia con algunas sales o metales pesados, aunque McCulloch *et al* (1989); y Cacho, (1993) señalan por ejemplo al Zinc como posible causa de interferencia, las concentraciones deberían ser muy altas, por lo menos 1200 ppm para matar un ratón en media hora; esta concentración es posible en zonas con descarga de efluentes de la industria minera, no siendo el caso de la Bahía de Ancón. El mercado de Ancón representa un riesgo potencial para la salud, pues si bien las concentraciones de VPM no superan el límite permisible, no se tiene ningún control sobre los moluscos provenientes de zonas no monitoreadas por la autoridad sanitaria de tal manera que no se podría saber si se comercializá moluscos contaminados; peor aún, los factores oceanográficos asociados a la presencia de biotoxinas marinas no se han estudiado localmente, de tal manera que dado algún cambio en estos podría aumentar la concentración de las toxinas VPM tornándose peligroso para la población.

Para el “Terminal pesquero de Ventanilla” los resultados obtenidos no son en realidad muy relevantes, pues siendo un mercado mayorista acopia moluscos de toda la costa norte del Perú y carecen de identificación alguna, de manera que la trazabilidad es imposible para identificar la procedencia; esto ocurre en otras partes del mundo ,como señala Reguera (2002), donde no se tiene ningun sistema de control para el mercado interno a pesar de tener un sistema sanitario para moluscos destinados a la exportacion , además muchas veces los moluscos expendidos son en realidad una

mezcla de varias áreas de extracción esto hace que el criterio de muestreo aplicado en el presente trabajo no sea el adecuado.

En Ancón la especie, *Gymnodinium sp.*, que se clasifica como fitoplancton potencialmente tóxico; fue la predominante llegando a alcanzar una concentración de hasta 8920 Cel/L, como se registró en febrero del 2008, cabe destacar que no existen datos de fitoplancton potencialmente tóxico dentro del periodo del presente estudio en los cuales las muestras de moluscos de esta zona dieron positivo a VPM, para establecer una posible relación; pero se tienen reportes de presencia de VPM en moluscos por parte del SANIPES en años anteriores como señala Flores (2007). De tal manera que existe una alta probabilidad de que tanto *Alexandrium sp.* y *Gymnodinium sp.* puedan ser las que ocasionan los eventos de VPM en esta zona, no se descarta ninguna tal como señala Reguera (2002), pues se tiene que realizar todo un proceso sistematizado para determinar el agente causante del episodio tóxico para cada zona o región en estudio; puesto que algunas microalgas originan los eventos tóxicos aun no siendo la especie predominante.

A lo largo de nuestro litoral se tienen registros de *Alexandrium sp.* y *Gymnodinium sp.*, siendo *Gymnodinium sp.* la microalga que se presenta con mayor concentración, superando ampliamente a *Alexandrium sp.* Según los datos analizados en el presente estudio, la mayor concentración de *Gymnodinium sp.* se registró en enero del 2008 en la estación Huacho llegando a 155000 Cel/L pero no se relacionó a presencia de toxinas en moluscos de la zona. Cabe mencionar que Huacho no es la zona con las mayores concentraciones para el litoral peruano en todos los años de monitoreo, puesto que según el SANIPES en marzo del 2008 en Laguna Grande – ICA se llegó a registrar una concentración de 2'352'000 Cel/L de la microalga *Gymnodinium sp.* lo cual ocasionó el cierre de esta zona por parte de la autoridad sanitaria; pero no se encontró presencia de toxinas VPM en molusco alguno siendo un cierre innecesario, tal como lo señala Reguera (2002) en el sentido que, la detección precoz de fitoplancton potencialmente tóxico no puede sustituir el análisis de toxinas y tampoco

se debe cesar el análisis de toxinas en los moluscos aún cuando haya desaparecido la especie tóxica o potencialmente tóxica del medio.

VII. CONCLUSIONES

- La estandarización del método para cuantificación del veneno paralizante de moluscos (VPM) de la Asociación Oficial de Químicos Analistas AOAC tiene como paso fundamental el cálculo del factor de conversión (FC), la estandarización para la detección de las VPM por bioensayo en ratón es un procedimiento laborioso, aun así es un método económico y aplicable sin necesidad de contar con infraestructura y equipos costosos para su realización.
- Las especies potencialmente tóxicas causantes de veneno paralizante de moluscos (VPM) en nuestro litoral pertenecen a los géneros *Alexandrium* y *Gymnodinium*, siendo las especies pertenecientes al género *Gymnodinium* las que se presentan en mayor concentración llegando a alcanzar hasta 155000 Cel/L en la estación Huacho).
- Existe presencia de toxinas veneno paralizante de moluscos (VPM), cuantificado en ausencia de mareas rojas. En *Aulocomya ater* (choro común) proveniente de zonas próximas a la Bahía de Ancón siendo la concentración máxima detectada de 48 μg Saxitoxina eq. 100 g^{-1} , que constituye un riesgo potencial para la salud del consumidor.

VIII. RECOMENDACIONES.

- Se deben realizar estudios que lleven a relacionar la presencia de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos, con las microalgas potencialmente tóxicas presentes en las zonas de extracción del recurso, utilizando métodos analíticos como HPLC y HPLC Masa/Masa.
- Se debe desarrollar líneas de investigación en nuestro país para el estudio de las biotoxinas marinas, desde el punto de vista biológico, bioquímico y oceanográfico.
- Se debe dar a conocer entre los profesionales de la salud, investigadores, público consumidor y gobiernos locales la importancia del estudio de las biotoxinas marinas en nuestro país y del peligro que estas representan.
- Se deben implementar métodos modernos para la detección de biotoxinas marinas en nuestro país, que conlleven a ir suprimiendo el sacrificio de animales de experimentación.
- Se deben desarrollar métodos rápidos de campo específicos para los perfiles químicos de las toxinas presentes en nuestro litoral, para un mejor monitoreo de las zonas de extracción y cultivo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN); Laboratorio de referencia de la Unión Europea de Biotoxinas Marinas (EURLMB). *Work Programme for the Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins* [en Línea]. 2010. [Citado 15-11-2010]. Disponible en <http://www.aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/program_de_trabajo_anual/WP-CRLMB-2010.pdf>.
2. Acres, J. and Gray, J. Paralytic shellfish poisoning. *Can Med Assoc J.* 1978, vol. 119, n° 10, p. 1195-1197.
3. Andrinolo, D.; Iglesias, V.; Garcia, C. and Lagos, N. Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicon.* 2002, vol. 40, n°6, p. 699-709.
4. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action, Official Method of Analysis 959.08; ed. Horwitz W. 17ava . *Association of Official Analytical Chemists.* 2000, p. 881-882.
5. Bances, U. *Marea Roja*. IMARPE Chiclayo. [En línea].2009. [Citado 29-10-2010] Disponible en: <<http://www.imarpe.gob.pe/chiclayo/Mareas%20Rojas/Mareas%20Rojas.htm> >
6. Bricel, M. and Shumway, S. Paralytic Shellfish Toxins in Bivalve Molluscs: Occurrence, Transfer Kinetics, and Biotransformation. *Reviews in fisheries science.* 1998, Vol. 6, n° 4, p. 315-383.
7. Centre for Enviroment, Fisheries and Aquaculture Sciences (CEFAS), Food Standards Agency. *Biotoxin Team Report* [En línea] . 2007. [Citado 15-09-2010] . Disponible en < <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/ukjrttestreport.pdf> >

8. Compagnon, D.; Lembeye, N.; Ruiz-Tagle, N. and Lagos, N. Accumulation of Paralytic Shellfish Poisoning toxin in the bivalve *Aulacomya ater* and two carnivorous. *Journal of Shellfish Research*. 1998, vol. 17, n° 1, p. 67-73.
9. Delgado, L. *Informe del Programa de Vigilancia de Fenómenos Algales Nocivos (FAN) en Chile*. Laboratorio de Toxinas Marinas; Instituto de Salud Pública de Chile. MINSAL-ISP-SEREMIS, 2009.
10. EFSA. Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *Commission on Marine biotoxin in shellfish- Saxitoxin* [En línea]. 2009. [Citado 15-11-2010]. Disponible en < <http://www.efsa.europa.eu/it/scdocs/doc/1019.pdf>. >
11. FAO, Biotoxinas Marinas. 1era ed. Roma: *FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 80*, 2005, p.1-52. ISBN. 95-5-105129-1
12. Fernandez, L.; Miguez, A.; Cacho, E.; Martinez, J. y Yasumoto, T. Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas. En: Sar E. A, Ferrario M.E y Reguera (edit.). *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Madrid: Instituto Español de Oceanografía (COI), 2002, p.79-122.
13. Flores, Y. Toxinas marinas y fitoplancton potencialmente tóxico: situación actual en el Perú. En: *X Curso COI-AECID-IEO sobre Biotoxinas Marinas*. Vigo, España, 9-25 Septiembre 2009.
14. Garcia, C.; Lagos, M.; Truan, D.; Lattes, K.; Vejar, O.; Chamorro, B.; Iglesias, V.; Andrinolo, D. and Lagos, N. Human intoxication with paralytic shellfish toxins: clinical parameters and analysis in plasma and urine. *Biol Res*. 2005, vol. 38, n° 2-3, p. 197-205.
15. Gibbard, J.; F.A.P.H.A and Naubert, J. Paralytic shellfish poisoning on the Canadian Atlantic Coast. *American Journal of Public Health*. 1948, vol. 38, p. 550-553.

16. Halstead, B.; Schantz, E. and World Health Organization. Paralytic shellfish poisoning. En: World Health Organization (Edit). *WHO offset publication; no. 79*. Geneva: World Health Organization, 1984, p. 21-37.
17. Hallegraeff, G.; Anderson, D.; Cembella, A. and Enevoldsen, H. *Manual on harmful marine microalgae*. Paris : UNESCO, 2003. 793p.ISBN. 923-1038710.
18. Hernández, M. y Gárate, I. Síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos. *Rev Biomed*. 2006, vol. 17, nº 1, p. 45-60.
19. Indrasena, W. and Gill, T. Thermal degradation of partially purified paralytic shellfish poison toxins at different times, temperatures, and pH. *Journal of food science*. 2000, vol. 65, nº 6, p. 948–953.
20. Lagos, N. Principales toxinas de origen fitoplanctónico: Identificación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En: Sar E.A. M.E. Ferrario B. Reguera (edit). *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Madrid: Instituto Español de Oceanografía (IEO), 2002,p. 55-63
21. Martins, C.; Alvito, P.; Tavares, M.; Pereira, P.; Doucette, G. y Franca, S. Reevaluation of production of paralytic shellfish toxin by bacteria associated with dinoflagellates of the portuguese coast . *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, vol. 69, nº 9, p. 5693-5698.
22. Moestrup, Ø.; Codd, G.; Elbrächter, M.; Faust, M.; Fraga, S.; Fukuyo, Y.; Cronberg, G.; Halim, Y.; Taylor, F. y Zingone, A .*Taxonomic Reference List of Toxic Algae*, *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO* .UNESCO (edit) .[Citado 20-12-2008] Disponible en <<http://ioc.unesco.org/hab/data.htm>>
23. Mons, M.; Van Egmond, H. and Speijers, G. Paralytic shellfish poisoning: *A review*. *RIVM*. Junio 1998. Report 388802 005.

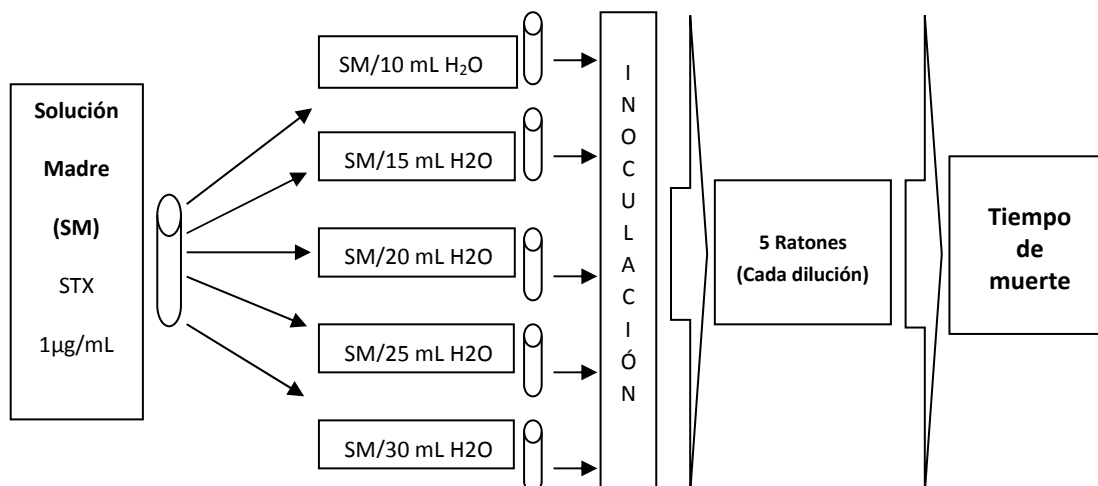
24. Quiñones, J. *Mercado y evolucion de las exportaciones pesqueras*. Prom Perú (edit). 2007. [Citado 2-01-2009] Disponible en <<http://www.prompex.gob.pe/Prompex/Documents/8d8661a5-0ade-4e80-809a-c58cdd6fefa4.pdf>>
25. Reguera, B. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas nocivas. En: Sar E.A. M.E. Ferrario B. Reguera (edit). *Floraciones Algaes Nocivas en el Cono sur Americano*. Madrid: Instituto Español de Oceanografía (IEO), 2002, p. 21-52, ISBN:84-95877-01-5.
26. Sánchez, S.; Delgado, E.; Villanueva, P.; Chang, F.; Bernal, A. y Jacobo, N. *Investigaciones en Floraciones Algaes Nocivas (FAN) Informe IMARPE anual 2007*. IMARPE(edit). 2008.
27. SANIPES. *Monitoreo de Fitoplancton Potencialmente Toxico departamento de ICA: Pisco y Chincha. Analisis Cuantitativo de Fitoplancton: Reporte 1era quincena de Marzo. 13 Marzo del 2008 / División de Control Sanitario del Medio Ambiente Acuicola*. Callao: SANIPES, 2008.
28. SANIPES. *Manual de métodos de ensayo para mariscos y aguas: Manual / Control Sanitario de Medio Ambiente Acuicola*. Callao: SANIPES, 2009. p.140
29. SANIPES. [En línea]. SANIPES (edit).2010a. [Citado 09-11-2010] Disponible en <<http://www.itp.gob.pe/moluscos-bivalvos/2010/index.php>>
30. SANIPES. *Control Sanitario del medio ambiente acuicola: Manual/División de Control Sanitario del Medio Ambiente Acuicola*. Callao: SANIPES, 2010b. p.63
31. Taleb, V. and Blaghen, M. Spatial and temporal evolution of PSP toxins along the Atlantic shore of Morocco. *Toxicon*. 2003, n° 41, p.199-205.

32. Union Europea (UE). Reglamento (CE) N° 853/2004, de 29 Abril del 2004, Del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Union Europea*, 30 de Abril de 2004.
33. Union Europea (UE). Reglamento (CE) N° 2074/2005, de 5 Diciembre del 2005, De la Comunidad Europea. *Diario Oficial de la Union Europea*, 22 de Diciembre del 2005.
34. Uribe, P. & Espejo, R. Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *Applied and environmental microbiology*. 2003, p. 659-662.
35. Wayne, D. *Bioestadística: Base para el analisis de las ciencias de la salud*. Quinta edicion. Mexico D.F: Limusa, 1996, p. 878.
36. Woolcott, D. "Biotoxinas Marinas en Perú". En: *X Curso COI-AECID-IEO sobre Biotoxinas Marinas*. Vigo, España. 9-25 Septiembre 2009.
37. Yasumoto, T. and Murata, M. Marine Toxins. *Chemical Reviews*. 1993, n° 93, p. 1897-1909.
38. Zevallos, S. y Cardenas, F. Reporte de floraciones algales en la Zona Sur del Litoral Peruano. En: *Exposiciones Orales Oceanografia Biologica*. Viña del Mar, Chile 2005.

XI. ANEXOS.

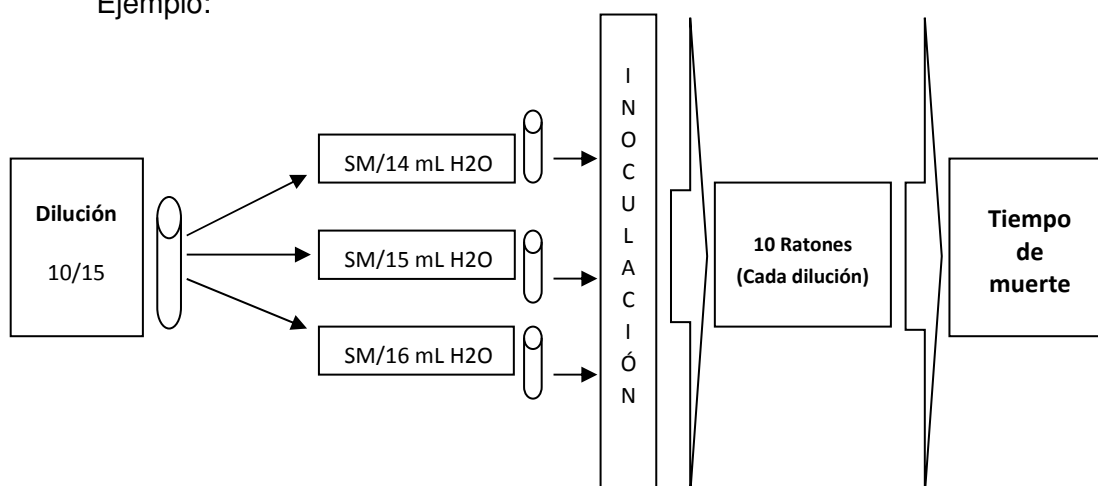
Anexo 1. CÁLCULO DEL FC

1. **Selección 1era dilución:** a partir de solución madre se corren 5 diluciones

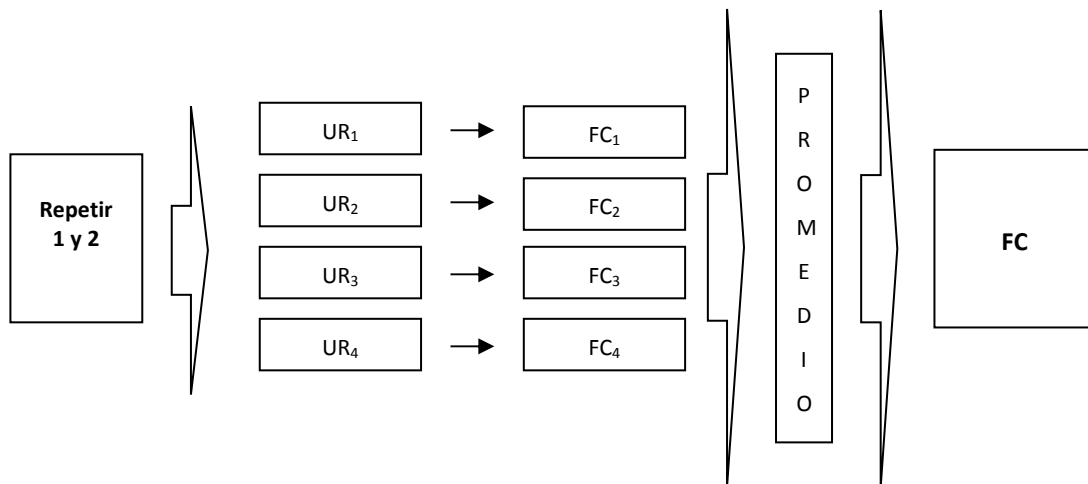


2. **Variación de 1mL de la primera dilución:** la dilución que se encuentre entre 5 y 7 minutos se corre otra vez y se realiza dos diluciones con 1 mL más y otra con 1 mL menos.

Ejemplo:



3. **Repetición de FC:** repetir los dos pasos anteriores “1 y 2” luego se calcula el UR para cada Tm determinado y se calcula el FC parcial; estos se promedian para obtener el FC final.



Anexo 2. BIOENSAYO EN RATÓN

1. Preparación de la muestra

Limpieza externa (Agua potable)



Desvalvado y drenado



Homogenizado

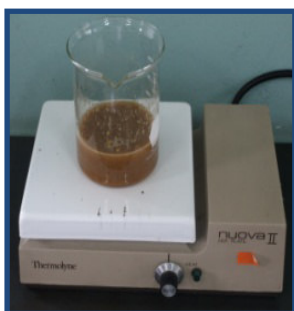


100 g +100 mL (HCl 0,1 M) pH:3



2. Extracción de la toxina

Hervir durante 5 min.



Centrifugar a 3000 rpm x 5 min.



Cargar sobrenadante en Jeringas 1 mL



3. Inoculación

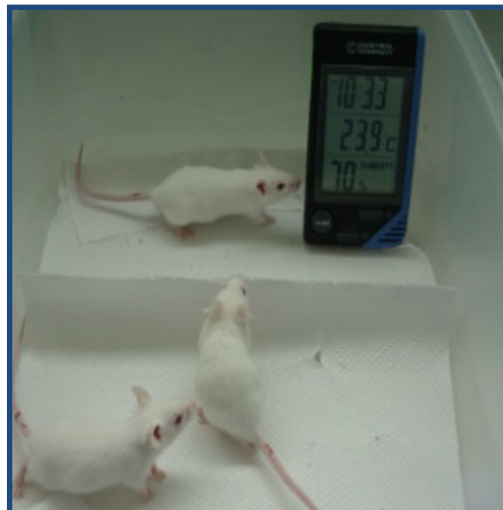
Sujeción del ratón



Inocular 3 ratones via intraperitoneal



Determinar el tiempo de muerte.



Anexo 3. Tabla de *Sommer* para tiempo de muerte (AOAC, 2000)

Tm (min y S)	Unidades de ratón (UR)	Tm (min y s)	Unidades de ratón (UR)
1:00	100	5:00	1.92
10	66.2	05	1.89
15	38.3	10	1.86
20	26.4	15	1.83
25	20.7	20	1.80
30	16.5	30	1.74
35	13.9	40	1.69
40	11.9	45	1.67
45	10.4	50	1.64
50	9.33		
55	8.42	6:00	1.60
		15	1.54
2:00	7.67	30	1.48
05	7.04	45	1.43
10	6.52		
15	6.06	7:00	1.39
20	5.66	15	1.35
25	5.32	30	1.31
30	5.00	45	1.28
35	4.73		
40	4.48	8:00	1.25
45	4.26	15	1.22
50	4.06	30	1.20
55	3.88	45	1.18
3:00	3.7	9:00	1.16
05	3.57	30	1.13
10	3.43		
15	3.31	10:00	1.11
20	3.19	30	1.09
25	3.08		
30	2.98	11:00	1.075
35	2.88	30	1.06
40	2.79		
45	2.71	12:00	1.05
50	2.63		
55	2.56	13	1.03
		14	1.015
4:00	2.5	15	1.000
05	2.44	16	0.99
10	2.38	17	0.98
15	2.32	18	0.972
20	2.26	19	0.965
25	2.21	20	0.96
30	2.16	21	0.954
35	2.12	22	0.948
40	2.08	23	0.942
45	2.04	24	0.937
50	2.00	25	0.934
55	1.96	30	0.917
		40	0.898
		60	0.875

Anexo 4. Tabla de *Sommer* para corrección de peso (AOAC, 2000)

Peso Ratón	Factor Corrección Peso
10.0	0.500
10.5	0.530
11.0	0.560
11.5	0.590
12.0	0.620
12.5	0.650
13.0	0.675
13.5	0.700
14.0	0.730
14.5	0.760
15.0	0.785
15.5	0.810
16.0	0.840
16.5	0.860
17.0	0.880
17.5	0.905
18.0	0.930
18.5	0.950
19.0	0.970
19.5	0.985
20.0	1.000
20.5	1.015
21.0	1.030
21.5	1.040
22.0	1.050
22.5	1.060
23.0	1.070